

WIPO PCT FILED 05 MAY 2005 534,043

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年5月21日 (21.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/040971 A1

(51) 国際特許分類⁷: A01K 67/027, C07K 16/18, C12P 21/08, C12N 5/10, A61K 39/395, C12N 15/09

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014221

(22) 国際出願日: 2003年11月7日 (07.11.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ: PCT/JP02/11598 2002年11月7日 (07.11.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社イムノキック (IMMUNOKICK INCORPORATION) [JP/JP]; 〒860-0085 熊本県熊本市高平1丁目30番69号 Kumamoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 阪口 薫雄 (SAKAGUCHI,Nobuo) [JP/JP]; 〒860-0085 熊本県熊本市高平1-30-69 Kumamoto (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI,Hiroshi et al.); 〒104-0028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 國際調査報告書
— 補正書・説明書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

A1

(54) Title: TRANSGENIC MAMMAL CARRYING GANP GENE TRANSFERRED THEREINTO AND UTILIZATION THEREOF

WO 2004/040971 A1

(54) 発明の名称: GANP遺伝子導入トランスジェニック哺乳動物及びその利用

(57) Abstract: It is intended to provide a high-affinity antibody efficacious as a diagnostic and a remedy for various diseases, a transgenic mammal for producing the antibody and a drug with the use of the high-affinity antibody or high-affinity antibody-producing cells. Thus, a transgenic mammal carrying a GANP gene transferred thereto, its offspring or part thereof and a process for producing a high-affinity antibody using the same.

(57) 要約: 本発明の目的は、各種疾患の診断薬及び治療薬として有効な高親和性抗体、当該抗体を産生するためのトランスジェニック哺乳動物、該高親和性抗体又は高親和性抗体産生細胞を用いた薬剤を提供することである。本発明によれば、GANP遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物、その子孫又はそれらの一部、並びにそれを用いた高親和性抗体の産生方法が提供される。

明 細 書

GANP 遺伝子導入トランスジェニック哺乳動物及びその利用

5 技術分野

本発明は、GANP 遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物及びその利用に関する。より詳細には、本発明は、GANP を高発現し、高親和性抗体を產生することができるトランスジェニック哺乳動物、該トランスジェニック哺乳動物を用いて高親和性抗体を產生する方法、及び得られた高親和性抗体の利用に関する。

10

背景技術

免疫系の機能は、T 細胞の効果を主とする細胞性免疫反応に基づく機能と抗体の効果を主とする液性免疫に基づく機能とに分類される。実際は、この両者の機能は協調して免疫応答が行われる。抗体は骨髄で生まれる B 細胞の細胞表面レセプターとして表出している。生体で形成される最初の抗体が認識する抗原の多様性は $10^9 \sim 10^{11}$ 個のオーダーに上ると言われ、そのような抗体（抗原レセプター）は、環境に存在しうるあらゆる抗原決定基を認識する。しかしながら、この多様な抗原レセプターは抗原に対して結合する能力は概して低く、低親和性の抗体が產生されることが多いが、これでは十分な免疫応答とはならない。

20 リンパ球、特に B 細胞/免疫グロブリン（抗体）は、その免疫反応に基づく各種用途、例えば病原体等の抗原検出のためのキット、診断薬、治療薬として利用されている。このような抗原検出薬、あるいは各種疾患治療薬における抗体として、抗原に対する反応性が高い抗体を使用すると、抗原に対する感度が優れ、かつ同一投与量での治療薬としての性能が優れる。しかしながら、これまでの所、抗体の親和性を高める手段は知られていない。

ところで、生体は病原体や異物が体内に侵入すると、それらを抗原として認識して、末梢のリンパ組織において、抗原と直接結合する抗体の V 領域の遺伝子に高頻度の体細胞突然変異を誘導する。その変化には T 細胞の刺激を必要としてお

り、胚中心(Germinal center)領域で活性化 T 細胞から刺激を受けると考えられる。近年、本発明者らはこの領域の活性化 B 細胞で選択的に発現が上昇する分子 GANP を見出している（国際公開 WO00/50611 号公報）。この分子は DNA ヘリカーゼ活性を有する MCM(minichromosome maintenance)と呼ばれる分子と直接結合し、さらに RNA プライマーゼ活性を有することから、DNA 複製に関連することが示唆されている。しかしながら、免疫系における GANP の機能については解明されていなかった。

発明の開示

10 本発明は、各種疾患の診断薬及び治療薬として有効な高親和性抗体、当該抗体を産生するためのトランスジェニック哺乳動物、該高親和性抗体又は高親和性抗体産生細胞を用いた薬剤を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、GANP 遺伝子を導入したトランスジェニック動物を作製し、抗原で免疫すると、このトランスジェニック動物は高親和性抗体を産生し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) GANP 遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物又はその子孫。

導入した GANP 遺伝子は B 細胞で発現することができる。また、本発明のトランスジェニック哺乳動物又はその子孫は、GANP 遺伝子をトランスフェクトした ES 細胞から発生させることができる。哺乳動物としては、例えばマウスが挙げられる。

(2) 前記トランスジェニック哺乳動物又はその子孫の一部。

(3) 前記トランスジェニック哺乳動物又はその子孫に抗原を投与し、得られる動物又は子孫から抗体を採取することを特徴とする高親和性抗体の製造方法。

(4) 前記(3)記載の方法により得られる高親和性抗体又はその断片。

本発明の抗体は、親和性が 1×10^{-7} (M) 以下で示されるものである。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

(5) 前記抗体又はその断片の V 領域を含む、ヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片。

(6) 前記抗体又はその断片、及び前記ヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片からなる群から選択される少なくとも 1 つを含有する医薬組成物。

5 (7) 抗原を投与した請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のトランスジェニック哺乳動物又はその子孫から採取される、高親和性抗体産生細胞。

図面の簡単な説明

図 1 は、抗 GANP モノクローナル抗体および ALP 結合抗ラット Ig 抗体を用いた免疫組織化学分析の結果を示す。スケールバーは 100 μm 。

図 2 は、雌 NZB マウスの膝窩のリンパ節中の GANPhⁱ 細胞の出現速度を示す。スケールバーは 100 μm 。

図 3 は、雌 NZB マウスの脾臓中の GANPhⁱ 細胞の出現速度を示す。スケールバーは 100 μm 。

15 図 4 は、複数系統のマウス由来の脾臓切片を抗 GANP モノクローナル抗体で染色した結果を示す。RP; 赤脾髄, F; 濾胞。スケールバーは 100 μm 。

図 5 は、脾臓の赤脾髄における GANPhⁱ 細胞の同定を示す。

図 6 は、GANPhⁱ 細胞における形質細胞マーカーの同定を示す。スケールバーは 100 μm 。

20 図 7 は、TD-Ag 免疫による C57BL/6 マウスの脾臓の赤脾髄領域における GANPhⁱ 細胞の発現を示す。スケールバーは 100 μm 。

図 8 A~C は、Daudi 細胞にマウス GANP を安定的に発現させたトランスフェクタントの体細胞突然変異を示す。

25 図 9 A~C は、B 細胞で GANP を過剰発現させたトランスジェニックマウスの作製の概要を示す。

図 10 は、GANP 過剰発現トランスジェニック (Tg) マウス又は野生型マウスにおける体細胞突然変異を解析した結果を示す。

図 11A~E は、B 細胞特異的 GANP 欠損マウス(B-GANP^{-/-})の作製の概要を示

す。

図 12 は、B 細胞特異的 GANP 欠損マウス(B-GANP^{-/-})を用いた細胞表面染色の結果（フローサイトメトリー）を示す。

図 13 は、B 細胞の増殖アッセイの結果を示す。ほとんど差はなかったが、抗

5 CD40 抗体刺激による増殖のみが約 1/2 に減少していた。

図 14 は、免疫をしていない Cre-flox/+マウス及び B-GANP^{-/-}マウス血清中の抗体値を示す。各種アイソタイプの抗体値に差はなかった。

図 15 は、B-GANP^{-/-}マウスにおける抗体産生を測定した結果を示す。

図 16 は、GC をピーナッツアグルチニンで染色した結果を示す。

10 図 17 は、B-GANP^{-/-}マウスにおける抗原特異的抗体産生を測定した結果を示す。

図 18 は、100 μg の NP-CG を免疫し、免疫後 14 日及び 35 日目における親和性の成熟の度合いをディファレンシャル ELISA により測定した結果を示す。

図 19 は、GC-B 細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。

20A～F は、Cre-flox/+ の V_H186.2 を PCR で增幅し、シークエンス解析を行った結果を示す (A から F に順に続く)。

図 20G～L は、Cre-flox/+ の V_H186.2 を PCR で增幅し、シークエンス解析を行った結果を示す (G から L に順に続く)。

図 21 は、Cre-flox/+ 及び B-GANP^{-/-}マウスにおける IgG1 の変異の頻度を示す。

図 22 は、V_H186.2 の 33 番目の W を L に変異させたときの変異の頻度を示す。

20 図 23 は、活性化誘導細胞死(AICD)の測定結果及びアポトーシスの抑制結果を示す。

図 24 は、抗 CD40 及び抗 CD95 刺激に対する細胞のアポトーシス感受性を測定した結果を示す。

図 25 は、TUNEL アッセイによりアポトーシス細胞を検出した結果を示す。

25 図 26 は、TUNEL アッセイによりアポトーシス細胞を検出した結果を示す。

図 27 は、アポトーシス抑制に関する Bcl-2 ファミリーの RNA 発現レベルを示す。

図 28 は、GANP トランスジェニックマウスを用いて高親和性抗体を產生した

結果を示す。

図 29 は、GANP トランスジェニックマウス由来のハイブリドーマクローンを用いて高親和性抗体を產生した結果を示す。

図 30 は、GANP トランスジェニックマウス由来のハイブリドーマクローン培養上清を用いた Biacore による結合解離曲線を示す。
5

図 31 は、GANP トランスジェニックマウス由来のハイブリドーマクローン培養上清を用いた Biacore による結合解離曲線を示す。

図 32 は、GANP-GST 融合タンパク質の構造の概略を示す。

図 33 は、MCM と直接結合する GANP の領域を決定するためのプルダウンアッセイの結果を示す。左に大きさのスタンダードの位置を示す。
10

図 34 は、in vitro 翻訳された MCM を用いたプルダウンアッセイの結果を示す。

図 35 は、GANP 各構築物と MCM の結合を免疫沈降によって示す。

図 36A～B は、GANP 各構築物と MCM の結合を免疫沈降によって示す。

図 37 は、GANP 構築物の構造の概要及び、構築物の細胞内での分布を示す。

15 図 38 は、GANP 構築物の細胞内での分布を示す。

図 39 は、MCM3 の核における局在化を示す。

図 40 は、GANP の発現によって誘導される MCM3 の細胞質局在化を示す。

図 41 は、核に局在する対照タンパク質を示す。

図 42 は、MCM3 変異体の局在化における GANP 構築物の効果を示す。

20 図 43 は、ヘテロカリオンアッセイによって検出される MCM3 の核・細胞質間シャトリングを示す。

図 44 は、細胞周期の間の GANP の局在化を示す。

発明を実施するための最良の形態

25 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、GANP 遺伝子を非ヒト哺乳動物に導入してトランスジェニック動物を作製し、そのようなトランスジェニック動物を抗原で免疫すると、高親和性の抗体が得られる知見に基づいて完成されたものである。

1. GANP

GANP は、胚中心結合核タンパク質(Germinal center-associated nuclear protein)と呼ばれており、酵母 Sac3 タンパク質とホモロジーを有する 210kDa の核タンパク質である (WO00/50611 号公報)。そして、SAC3 はアクチン形成の抑制物質として特徴づけられている。また、GANP は、濾胞樹状細胞(follicular dendritic cells: FDC)により囲まれる胚中心(germinal center, GC)B 細胞において選択的にアップレギュレートされ、リン酸化依存性 RNA・プライマーゼ活性を有し、B 細胞の細胞周期調節に関与しているタンパク質である (Kuwahara, K. et al., (2000) Blood 95, 2321-2328)。

本発明においては、GANP タンパク質のアミノ酸配列を、マウスについて配列番号 2 に、ヒトについて配列番号 4 に示す。また、GANP タンパク質をコードする遺伝子 (GANP 遺伝子という) の塩基配列を、マウスについて配列番号 1 に、ヒトについて配列番号 3 に示す。なお、上記アミノ酸配列及び塩基配列は、国際公開 WO00/50611 号公報にも記載されている。

また GANP タンパク質は変異体でもよく、配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列において 1 又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列であって RNA プライマーゼ活性を有するタンパク質であってもよい。例えば、配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列のうち 1 若しくは複数個 (好ましくは 1 個又は数個 (例えば 1 個~10 個、さらに好ましくは 1 個~5 個)) のアミノ酸が欠失しており、1 若しくは複数個 (好ましくは 1 個又は数個 (例えば 1 個~10 個、さらに好ましくは 1 個~5 個)) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されており、及び／又は 1 若しくは複数個 (好ましくは 1 個又は数個 (例えば 1 個~10 個、さらに好ましくは 1 個~5 個)) の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ上記 GANP タンパク質と同様の RNA プライマーゼ活性を有する GANP 変異型タンパク質を使用することもできる。

「RNA プライマーゼ活性」とは、RNA 複製において、5'→3'方向に進む鎖の伸長とは逆向きの鎖 (ラギング鎖) を合成する際に、伸長の開始点となる短いプライマーの RNA を合成する酵素活性を意味する。通常は α プライマーゼと呼ばれ

る DNA ポリメラーゼ α と結合する分子が用いられるが、胚中心 B 細胞では第二のプライマーゼである GANP プライマーゼも誘導されている。

GANP タンパク質は、上記配列番号 2 若しくは 4 に示すアミノ酸配列又はこれらの変異型アミノ酸配列のほか、N 末端側の一部の配列（例えば配列番号 2 に示すアミノ酸配列の 1~600 番、好ましくは 139~566 番）又はこれらの変異型アミノ酸配列を有するものも含まれる。

本発明において、動物に導入するための GANP 遺伝子は、上記 GANP タンパク質、N 末側の一部の配列、又は変異型タンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。そのような遺伝子として、例えば配列番号 1 又は 3 に示す塩基配列を有するものを使用することができる。配列番号 1 又は 3 に示す塩基配列のうち、コード領域のみの塩基配列であってもよい。また、上記配列番号 1 又は 3 に示す塩基配列に相補的な配列と、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、RNA プライマーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を使用することも可能である。

「ストリンジエントな条件」とは、ハイブリダイズさせた後の洗浄時の条件であって塩（ナトリウム）濃度が 150~900mM であり、温度が 55~75°C、好ましくは塩（ナトリウム）濃度が 250~450 mM であり、温度が 68°C での条件をいう。

遺伝子に変異を導入するには、Kunkel 法や Gapped duplex 法等の公知手法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えば GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (インピトロジェン社製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km 等：タカラバイオ社製) を用いて行うことができる。

変異遺伝子の詳細並びに取得方法は国際公開 WO00/50611 号公報にも記載されている。

なお、抗 μ 抗体及び抗 CD-40 モノクローナル抗体で B 細胞を *in vitro* 刺激すると、GANP 発現のアップレギュレーションのみならず、GANP タンパク質のアミノ酸配列のうち特定のセリン残基（例えば 502 番目のセリン: S502）のリン酸化を引き起こす。この反応は、GANP の RNA-プライマーゼ活性についてキーと

なる反応である(Kuwahara, K. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 10279-10283)。GANP タンパク質の N 末端側の RNA-プライマーゼドメインはセリン残基を含んでおり、そのリン酸化は *in vitro* において Cdk2 によって触媒される。C 末端側ドメインにより、GANP は MCM3 複製ライセンシング因子に 5 結合する(Kuwahara, K. et al., (2000) Blood 95, 2321-2328; Abe, E. et al. (2000) Gene 255, 219-227)。

2. GANP 遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物

本発明は、GANP 遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物に関するもの 10 であり、当該トランスジェニック哺乳動物は、好ましくは、導入した GANP 遺伝子を B 細胞で発現することができる。

(1) GANP 遺伝子とその関連分子

GANP 遺伝子とその関連分子で形成される複合体は、遺伝子に変異を誘導するプロセスで直接および間接的に必要な分子である。GANP タンパク質は、遺伝子 15 変異を修復する際に、高親和性の抗体が得られるように V 領域の変異の誘導を促す能力を保有していることから、本発明のトランスジェニック哺乳動物は、この GANP 遺伝子又はその変異遺伝子の導入によって、獲得性免疫の高親和性抗体産生を促進することができる。また、この遺伝子を過剰に発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、速やかに抗原に対する結合力の高い抗体を產生するこ 20 ができる。従って、上記トランスジェニック非ヒト哺乳動物を所定の抗原で免疫することで、従来では得られないような高親和性の抗体を簡便に得ることができる。その結果、難治性の病原微生物や異物を排除できるポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を得ることができる。また、本発明のトランスジェニック哺 25 乳動物を用いてヒト型化抗体を作製することによって、あるいは、本発明のトラン ジェニック哺乳動物が產生する抗体の V 領域を含む一本鎖抗体を作製することによつて、抗体療法の効力を飛躍的に高めることが可能となる。

本発明のトランスジェニック哺乳動物は、GANP 又はその変異遺伝子の導入によつて、B 細胞で高親和性抗体の產生を促進することができ、前記高親和性抗体

產生細胞はアポトーシスを誘導するシグナルに対して抵抗性を有する。

本発明者らは、GANP が獲得免疫応答の抗体産生に機能している分子であることを確認するため、先ず GANP 遺伝子の欠損マウスを B 細胞選択的に欠損する 5 ように企図して作製した。その結果、GANP 遺伝子が欠損しても、免疫系の細胞の発達、分化、増殖には影響が見られず、また抗体の産生総和には大きな変化は見られないことが判明した。

ここで、抗原と反応した B 細胞がそのまま増殖し、抗体産生細胞に分化するものは、ある種の抗原の場合に限られており、通常の抗原に対する抗体産生について 10 は T 細胞の共存を必要とする。T 細胞が存在しなくても抗体が産生されるような抗原を T 細胞非依存性抗原という。これに対し、T 細胞非依存性抗原以外の一般の抗原を T 細胞依存性抗原という。T 細胞依存性抗原の場合は、B 細胞の抗体産生細胞への分化がヘルパー T 細胞により補助される。

病原ウイルスの抗原決定基（抗原エピトープとも言う）の多くはそれ自体免疫 15 原性が弱く、T 細胞によって認識されるキャリアタンパク質のペプチド抗原によって活性化を受ける。

本発明においては、通常の動物では、強力な抗体を産生できないような可溶性の抗原に対する抗体産生応答に対して、GANP 遺伝子導入動物では高頻度に高親和性の抗体を産生することができることを調べるために、ハプテンとして解析が進 20 んでいるニトロフェニル基 (NP 基)をニワトリ・ガンマグロブリンと結合させて抗原(NP-CG という)を作製し、T 細胞性依存性抗原の反応を調べた。

ここで、C57BL/6 マウスの NP に対する反応は単一の V 領域で行われることが知られている。この反応は、抗体の IgG 重鎖の V 領域 ($V_H186.2$ という) と L 鎖ラムダ 1 遺伝子によってのみ形成されるというものである。このシステムを使 25 えば、アイソタイプが IgG₁ の抗体について、 $V_H186.2$ のアミノ酸配列を調べることによって高親和性抗体の遺伝子変異を調べることが可能である。しかも、最も強い親和性は、重鎖 V 領域 ($V_H186.2$) のアミノ酸配列のうち、第 33 番目のアミノ酸であるトリプトファン(W)がロイシン(L)に変異(W33-L)したときに生じ

ることが報告されている。

そこで、本発明者は、GANP 遺伝子欠損マウスで W33-L 変異を起こさせたときに、高親和性抗体が產生されるか否かを調べた。その結果、対照である Cre-flox/+マウスに比べて高親和性抗体產生はほとんど見られなかった。従って、
5 GANP 遺伝子は、高親和性抗体を產生するための重要な機能を有する遺伝子であることが判明した。このことをさらに検証するために、GANP 遺伝子を過剰に発現するマウスを作製した。GANP 遺伝子の過剰発現は、マウス免疫グロブリンプロモーター部分とヒト免疫グロブリン遺伝子イントロンエンハンサー部分を
10 GANP 遺伝子の 5'側に連結して、B 細胞で選択的に発現させることによって行った。

上記 GANP 過剰発現マウスも正常に生まれ、リンパ組織の発達、分化、増殖には変化が見られないが、NP-CG に対する反応では、著しく高親和性型の V 領域遺伝子(W33-L)が増加していた。RNA プライマーゼ活性がこの際にどのような機能的な役割を担っているかについてはまだ確定されていないが、(i) GANP 分子の
15 プライマーゼ活性をみる指標となる 502 番目のセリン残基のリン酸化が胚中心の高親和性 B 細胞の生み出される領域の細胞（セントロサイト）に高いこと、(ii) Daudi 細胞への *ganp* 遺伝子導入実験によって誘導される V 領域の突然変異の頻度が高いことから、GANP 分子の RNA プライマーゼ活性あるいはそれに関わる
20 502 番目のセリン残基のリン酸化が高親和性抗体產生に関連していると考えている。この結果は、GANP 分子を高発現させること、及び RNA プライマーゼ活性を賦活化することが、免疫応答による高親和性抗体の產生に必要であることを示すものである。

(2) GANP 遺伝子導入用哺乳動物

25 本発明における「哺乳動物」とは、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター及びモルモット等の任意の非ヒト哺乳動物を意味し、好ましくはマウス、ウサギ、ラットまたはハムスターであり、特に好ましくはマウスである。

本発明のトランスジェニック哺乳動物は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）の細胞に対して、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE・デキストラン法などにより、GANP 遺伝子を導入することにより作製することができる。また、上記遺伝子導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする GANP 遺伝子を転移させ、細胞培養、組織培養などに利用することもできる。さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより、トランスジェニック哺乳動物を作製することもできる。

GANP 遺伝子を対象動物に導入させる際、当該遺伝子を対象となる動物の細胞で発現させうるプロモーターの下流に連結した遺伝子構築物として導入することが好ましい。具体的には、目的とする GANP 遺伝子を有する各種哺乳動物由来の GANP 遺伝子を発現させうる各種プロモーターの下流に、GANP 遺伝子を連結したベクターを、対象となる哺乳動物の受精卵（例えば、マウス受精卵）にマイクロインジェクションすることによって、目的とする GANP 遺伝子を高発現するトランスジェニック哺乳動物を作製することができる。

(3) 発現ベクター

GANP 遺伝子の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、入ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルス又はバキュロウイルスなどの動物又は昆虫ウイルスなどが用いられる。

遺伝子発現の調節を行うプロモーターとしては、たとえばウイルス由来遺伝子のプロモーター、各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）および鳥類（ニワトリなど）由来遺伝子のプロモーターなどを使用することが可能である。

ウイルス由来遺伝子のプロモーターとしては、例えばサイトメガロウイルス、

モロニー白血病ウイルス、JC ウィルス、乳癌ウイルス等由来遺伝子のプロモーターが挙げられる。

各種哺乳動物及び鳥類由来遺伝子のプロモーターとしては、例えば、アルブミン、インスリン II、エリスロポエチン、エンドセリン、オステオカルシン、筋クレアチニナーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチン K1,K10 および K14、コラーゲン I 型および II 型、心房ナトリウム利尿性因子、ドーパミン β -水酸化酵素、内皮レセプターチロシンキナーゼ、ナトリウムカリウムアデノシン 3' リン酸化酵素、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネイン I 及び IIA、メタロプロテイナーゼ 1 組織インヒビター、MHC クラス I 抗原、平滑筋 α アクチン、ポリペプチド鎖延長因子 1 α (EF-1 α) 、 β アクチン、 α 及び β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖 1 及び 2、ミエリン基礎タンパク、血清アミロイド P コンポーネント、ミオグロビン、レニンなどの遺伝子のプロモーターが挙げられる。

上記ベクターは、トランスジェニック哺乳動物において目的とするメッセンジャー-RNA の転写を終結するターミネーターを有していてもよい。その他、GANP 遺伝子をさらに高発現させる目的で、各遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核生物遺伝子のイントロンの一部をプロモーター領域の 5' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間、あるいは翻訳領域の 3' 下流 に連結することも所望により可能である。

本発明の好ましい態様では、免疫グロブリンプロモーターの下流に GANP 遺伝子を連結することにより、あるいはヒト免疫グロブリン遺伝子イントロンエンハンサー部分を GANP 遺伝子の 5' 側に連結することにより、GANP 遺伝子を B 細胞で選択的に発現させることができる。

(4) GANP 遺伝子の導入

受精卵細胞段階における GANP 遺伝子の導入は、対象の哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保することが好ましい。遺伝子導入後の作出動物の胚芽細胞において GANP 遺伝子が過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに GANP 遺伝子を過剰に有す

ることを意味する。そして、遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに GANP 蛋白質を過剰に有する。

本発明においては、導入遺伝子を相同染色体の一方に持つヘテロ接合体を取得し、ヘテロ接合体同士を交配することで導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモ接合体を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が導入さ

5 れた GANP 遺伝子を安定に保持する。そして、GANP 遺伝子を過剰に有することを確認して、通常の飼育環境で繁殖継代することができる。

トランスジェニック対象動物が有する内在性の遺伝子とは異なる遺伝子である外来性 GANP 遺伝子を対象非ヒト哺乳動物（好ましくはマウスなど）、又はその
10 先祖の受精卵（バッククロス）に転移する際に用いられる受精卵は、同種の雄哺乳動物と雌哺乳動物を交配させることによって得られる。

受精卵は自然交配によっても得られるが、雌哺乳動物の性周期を人工的に調節した後、雄哺乳動物と交配させる方法が好ましい。雌哺乳動物の性周期を人工的に調節する方法としては、例えば、初めに卵胞刺激ホルモン（妊娠馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)）、次いで黄体形成ホルモン（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)）を、例えば腹腔注射などにより投与する方法が好ましい。
15

得られた受精卵に、前述の方法により外来性 GANP 遺伝子を導入した後、雌哺乳動物に人工的に移植・着床することにより、外来性遺伝子を組み込んだ DNA を有する非ヒト哺乳動物が得られる。雌哺乳動物に黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)を投与後、雄哺乳動物と交配させることにより受精能を誘起された偽妊娠雌哺乳動物に、受精卵を人工的に移植・着床させる方法が好ましい。遺伝子を導入する全能性細胞としては、マウスの場合、受精卵や初期胚を用いることができる。また培養細胞への遺伝子導入法としては、トランスジェニック哺乳動物個体の産出効率や次代への導入遺伝子の伝達効率を考慮した場合、DNA のマイ
20 クロインジェクションが好ましい。
25

遺伝子を注入した受精卵は、次に仮親の卵管に移植され、個体まで発生し出生した動物を里親につけて飼育させたのち、体の一部（マウスの場合には、例えば、尾部先端）から DNA を抽出し、サザン解析や PCR 法により導入遺伝子の存在を

確認することができる。導入遺伝子の存在が確認された個体を初代 (Founder) とすれば、導入遺伝子はその子(F1)の 50%に伝達される。さらに、この F1 個体を野生型動物または他の F1 動物と交配させることにより、2 倍体染色体の片方 (ヘテロ接合) または両方 (ホモ接合) に導入遺伝子を有する個体(F2)を作製することができる。

あるいは、GANP 蛋白質高発現トランスジェニック哺乳動物は、上記した GANP 遺伝子を ES 細胞 (embryonic stem cell) に導入することによって作製することもできる。例えば、正常マウス胚盤胞 (blastocyst) に由来する HPRT 陰性 (ヒポキサンチングアミニン・フォスフォリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を欠いている) ES 細胞に、GANP 遺伝子を導入する。当該 GANP 遺伝子がマウス内在性遺伝子上に相同組み換えを起こさせ、インテグレートされた ES 細胞を HAT セレクション法により選別する。次いで、選別した ES 細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵 (胚盤胞) にマイクロインジェクションする。得られた胚盤胞を、仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。その後、仮親マウスからキメラトランスジェニックマウスが生まれる。生まれたキメラトランスジェニックマウスを正常マウスと交配させることにより、ヘテロトランスジェニックマウスを得ることができる。そして、ヘテロトランスジェニックマウス同士を交配することにより、ホモトランスジェニックマウスが得られる。

本発明においては、上記したトランスジェニック哺乳動物に限らず、その子孫、並びにトランスジェニック哺乳動物又はその子孫の一部も本発明の範囲内である。トランスジェニック哺乳動物の一部としては、当該トランスジェニック哺乳動物又はその子孫の組織、器官及び細胞などが挙げられ、器官または組織としては、脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄あるいは扁桃腺などが挙げられ、細胞としては B 細胞などが挙げられる。

本発明のトランスジェニック哺乳動物は、B 細胞をさらに活性化する哺乳動物と交配することも可能であり、これによりさらに高親和性抗体を産生することが可能である。

最近、MRL/lpr マウスで B 細胞が末梢のリンパ節での活性化の際に胚中心を経

過した後、T 細胞領域でさらに V 領域の突然変異誘導が亢進していることが報告されている。また、本発明者らも MRL/lpr マウスにおいて GANP 遺伝子が Ig プロモーター、エンハンサーの下流に結合して作成した *ganp* トランスジェニックマウスに見られるのと同等の高い発現が、非免疫の状態で見られることを見出している。⁵ このことは、正常では自己の抗原に対しては高親和性の抗体はできないのに対して、この自己免疫疾患マウスでは、GANP 分子の異常な活性化が起こるために、自己の抗原に対しての高親和性抗体が產生されることとなる可能性が示唆される。

そこで、上記 B 細胞をさらに活性化する動物として、自己免疫疾患マウスであるとされる MRL/lpr, NZB, (NZB × NZW)F1 などを用いれば、さらに高い変異誘導を期待できる。¹⁰

以上のことを利用した MLR/lpr マウスの GANP トランスジェニックマウスを作製することによって、スーパー高親和性抗体產生マウスを作出できる可能性がある。すなわち、本発明の GANP 遺伝子過剰発現トランスジェニック哺乳動物と¹⁵ さまざまな自己免疫疾患モデル動物との交配により、高親和性抗体を產生できる哺乳動物を作製することができる。

3. 高親和性抗体の作製

本発明でいう抗体とは、抗原と特異的に結合する活性を有する蛋白質を意味し、²⁰ 好ましくは B 細胞が產生するものである。本発明では、抗原に対する反応性が高い抗体のことを高親和性抗体と言う。「高親和性」とは、抗体が抗原と結合する結合能が高いことを意味し、本発明においては、抗体の結合能が一般のマウスなどの動物を用いて作製した抗体と比較して高く、また逆に当該の抗原から解離することが遅い抗体のことをいう。これは、抗原決定基（エピトープ）に対して、立体的に密接して結合する能力が高く特異的であることを意味するとともに、抗体が結合することによって抗原決定基のみならずその抗原の構造の変換をきたすことによって結果的に強力な活性（毒性の中和、ウイルスなどの感染性阻止、病原体の不活性化、生体内からの排除の促進、抗原分子の変性を引き起こす等、生物

活性を示すもの) を示すことも包含している。

また、抗体の結合能(親和性)は、スキャッチャード解析やBiacoreと呼ばれる表面プラズモン共鳴センサーにより、解離定数(KD)、解離速度定数(Kdiss)、結合速度定数(Kass)として測定することができる。Biacore装置は、センサーチップ、マイクロ流路系、SPR検出系の3つの技術を統合して分子結合の強さ、速さ、選択性を測定するというものであり、標識を使わずにリアルタイムで生体分子の

5 検出と複数個の分子間での相互作用のモニタリングを行うことができる。Biacore装置としては、例えばBiacore 3000、Biacore 2000、Biacore X、Biacore J、Biacore Q(いずれもBiacore社)などが挙げられる。

10 上記Biacoreによって、抗体の親和性を示すパラメーター、すなわち解離定数(KD)、解離速度定数(Kdiss)[1/Sec]及び結合速度定数(Kass)[1/M.Sec]を測定する。

15 抗体は、解離定数(KD値)が小さい値であるほど親和性が高いという点で好ましい。抗体の結合能(親和性)は、Kdiss及びKassの2つのパラメーターにより決定され、

$$KD[M] = Kdiss/Kass$$

により表わされる。

20 抗原の種類等複数の要因によって、得られる抗体の親和性は異なるが、一般には、KD値は 1×10^{-7} (M)以下であることが好ましく、例えば 1×10^{-8} (M)以下、 1×10^{-10} (M)以下、あるいは 1×10^{-11} (M)以下のものが挙げられる。

本発明においては、作製された抗体が上記いずれかの作用又は性質を發揮する抗体であるときに、「高親和性」であると判断される。

25 抗体分子の親和性亢進は抗体遺伝子の可変領域(V領域)遺伝子に体細胞突然変異(SHM)が誘導することによって生まれる。抗体の抗原に対する特異性は、抗原を生体に免疫した当初から認められるが、初期の抗体の多くはIgMクラスであり、また抗原に対する結合親和性は高くはなく、病原体や異物を除去したり、不活化する能力は低い。しかし、抗原を生体に投与して数回の追加免疫を行うと

抗体の抗原に対する結合親和性が高まる。この際、B 細胞は T 細胞からの刺激が必要であり、末梢のリンパ組織の胚中心領域でその活性化が行われるとされている。V 領域遺伝子の突然変異誘導に必要な分子としては、最近、胚中心で発現する RNA エディティング分子 AID であると報告されている。さらに、ウラシル
5 DNA グリコシダーゼ、また DNA 複製に必要な DNA ポリメラーゼとしてミスを生じやすい DNA ポリメラーゼゼータ (ζ) とアイオタ (η) が関与していることが報告されているが、これらの機能を制御する分子はまだ明らかにされていない。GANP 分子は新たな SHM 誘導分子としてその機能が明らかにされたものであり、その分子の発現上昇が SHM 誘導に重要な鍵を握る。とりわけ、高親和性
10 抗体を産生するために重要であることが明らかになった。

C57BL/6 マウスにハプテン・キャリアの抗原としてニトロフェニル-ニワトリ
γグロブリンを免疫することにより誘導される抗体は、H鎖は V_H186.2 ローカス
を用い、L鎖は λ1 である。この際、追加免疫をして得られる抗体は IgG₁ 抗体で
あり、そのうち特に結合親和性の高い抗体の V 領域配列に誘導される突然変異は、
15 33 番目のトリプトファンがロイシンに変異したものであることが知られている。
本明細書の実施例では、このモデルシステムで高い高親和性型の V 領域突然変異
が誘導されており、これは、高親和性抗体が誘導されたことを示す分子レベルでの
明らかな証拠であると言える。

従って、上記トランスジェニック哺乳動物又はその子孫に抗原を投与して抗体
20 を産生することによって、高親和性抗体を得ることができる。即ち、GANP 蛋白
質を高発現させた動物に目的とする抗原を常法によって投与し、感作された動物
の血液又は脾臓等の組織（これらの組織に限定されない）のリンパ球より高親和
性抗体を調製することができる。高親和性抗体はポリクローナル抗体でもモノク
ローナル抗体でもよい。

25 ポリクローナル抗体を産生する方法としては、例えば、抗原を本発明のトラン
スジェニック哺乳動物に投与して免疫し、免疫された哺乳動物から血液を採取し、
採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。

免疫感作の方法は当業者に公知であり、例えば抗原を 1 回以上投与することに

より行うことができる。

抗原の種類は特に限定されるものではなく、抗原決定基としての立体構造を持ちうる物質すべてが該当し、タンパク質、酵素、ペプチド、糖、脂質、DNA、RNA、
プリオンなどのあらゆる生体成分のほか、癌抗原、ウイルス抗原、有機、無機合

5 成抗原など任意のものを使用することができる。

抗原投与は、例えば7～30日間隔で2～3回投与すればよい。投与量は1回につき、例えば抗原約0.05～2mg程度とすることができます。投与経路も特に限定されず、皮下投与、皮内投与、腹膜腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができるが、静脈内、腹膜腔内もしくは皮下に注射することにより投
10 与することが好ましい。また、抗原は適当な緩衝液、例えば完全フロイントアジュバント又は水酸化アルミニウム等の通常用いられるアジュバントを含有する適当な緩衝液に溶解して用いることができるが、投与経路や条件等に応じてアジュバントを使用しない場合もある。

免疫感作した哺乳動物を一定期間飼育した後、哺乳動物の血清をサンプリング
15 し、抗体価を測定する。抗体価が上昇してきたときに、例えば100μg～1000μgの抗原を用いて追加免疫を行なうことができる。最後の投与から1～2ヶ月後に免疫感作した哺乳動物から血液を採取して、その血液をタンパク質の分離に採用される各種常法、例えば遠心分離、硫酸アンモニウム又はポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、
20 アフィニティーコロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等によって、ポリクローナル抗血清として、ポリクローナル抗体を得ることができる。

モノクローナル抗体を產生する方法としては、ハイブリドーマ法を挙げることができる。先ず、アジュバント中に目的とする抗原を構成するペプチドを懸濁し、得られる懸濁液を、免疫動物（即ち、本発明のトランスジェニック哺乳動物）の皮下または真皮内に投与する。抗原の種類は前記と同様である。用いられるアジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント、BCG、トレハロースダイマイコレート(TDM)、リポ多糖(LPS)、ミョウバンアジュバント、シリカアジュバント等が挙げられるが、抗体の誘導能等の関
25

係から、フロイントの完全アジュvant(CFA)とフロイントの不完全アジュvant(IFAV)とを組み合わせて使用することが好ましい。

モノクローナル抗体の產生において、免疫動物は抗原の初回免疫後、更に、追加免疫を数回行い、適當な日数を経過した後に部分採血を行い、抗体価を測定する5ことが好ましい。本発明の方法で產生される抗体は高親和性抗体であるため、上記免疫は初回のみで十分である可能性がある。なお、抗体価は、例えば酵素イムノアッセイ（以下「ELISA」という）法等、公知の方法により測定することができる。

次いで、感作の終了した免疫動物から脾臓を摘出し、B細胞を得る。この際、10抗原に結合するB細胞を得ることが、その後のスクリーニングを軽減できる点で好ましい。ここで得られるB細胞は高親和性抗体產生細胞であり、これをそのまま免疫賦活剤として使用することもできる。また、B細胞から直接V領域遺伝子を得て、そのV領域の体細胞突然変異を測定することもできる。

次いで、B細胞を常法に従いミエローマ細胞と融合させて抗体產生ハイブリド15一マを作製する。例えば、マウスの場合であれば、脾臓を摘出し、摘出した脾臓を、例えばハンクスの平衡塩溶液(HBSS)中に置き、ピンセットで細胞を押し出して脾臓リンパ球(B細胞)を得る。得られた脾臓リンパ球は、トリパンブルー等の染色液で染めて生細胞数をカウントし、ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマとする。

20 細胞融合に用いられるミエローマ細胞は特に限定されず、公知のものを使用できる。例えば、P3-X63.Ag8(X63)、P3-X63.Ag8.U1(P3U1)、P3/NS I/1-Ag4-1(NSI)、Sp2/0-Ag14(Sp2/0)等を挙げることができる。ミエローマ細胞の選択にあたっては、抗体產生細胞との適合性を適宜考慮する。

細胞融合は、血清を含まないDMEM、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用25培地中で、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/mlの抗体產生細胞と $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個/mlのミエローマ細胞とを混合し（抗体產生細胞とミエローマ細胞との細胞比5：1が好ましい）、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行う。

細胞の融合方法は、センダイウイルス法、ポリエチレングリコール法、プロト

5 プラスト法等、当該分野で公知の方法を任意に選択して用いることができるが、特にポリエチレングリコール法が、細胞毒性が比較的少なく、融合操作も簡単であるという理由から好ましい。細胞融合促進剤としてのポリエチレングリコールは、平均分子量 1000～6000 ダルトンのものを使用することができる。なお、抗体を大量に作り出したい場合は、ビニルピリジン誘導体で刺激した抗体産生細胞と骨髄腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマを用いることが好ましい。

10 得られたハイブリドーマは、常法に従い、HAT 培地（ヒポキサンチン、アミノブテリン、およびチミジン含有培地）中で適当な期間培養し、ハイブリドーマの選択を行う。次いで、目的とする抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った後、ハイブリドーマのクローニングを行う。

15 スクリーニング法としては、公知の抗体検出方法を用いることができ、例えば、ELISA 法、ラジオイムノアッセイ（以下「RIA」という）法、ラーク法、凝集反応法等を用いることができる。また、クローニング法としては、当該分野で公知の方法を用いることができ、例えば、限界希釈法、軟寒天法および FACS 法等を用いることができる。得られたハイブリドーマは、適当な培養液中で培養するか、あるいはハイブリドーマと適合性のある、例えばマウス腹腔内に投与する。こうして得られる培養液中または腹水中から、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濃過、アフィニティーコロマトグラフィー等により、所望のモノクローナル抗体を単離精製することができる。

20 また、上記した抗体の断片及び V 領域の一本鎖抗体も本発明の範囲内である。抗体の断片としては、前述したポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (variable fragment of antibody)、 sFv 、 $dsFv$ (disulphide stabilized Fv) あるいは dAb (single domain antibody) 等が挙げられる。ここで、「 $F(ab')_2$ 」及び「 Fab' 」とは、イムノグロブリン（モノクローナル抗体）を、それぞれ蛋白分解酵素であるペプシン、パパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の 2 本の H 鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgG をパパインで処理すると、ヒンジ領域中の 2 本の H 鎖間に存在する

ジスルフィド結合の上流で切断されて V_L (L 鎖可変領域) と C_L (L 鎖定常領域) からなる L 鎖、及び V_H (H 鎖可変領域) と $C_{H\gamma 1}$ (H 鎖定常領域中の $\gamma 1$ 領域) とからなる H 鎖フラグメントが C 末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々 Fab' という。また IgG をペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本の H 鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つの Fab' がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$ という。一本鎖抗体は、 V_L と V_H をリンカーでつないだ構造を持つ。

10 本発明の高親和性抗体はヒト型化抗体やヒト抗体でもよい。これらの抗体は、免疫系をヒトのものに入れ換えた哺乳動物を用いて、該哺乳動物を免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様に直接ヒト抗体を作製することができる。

ヒト型化抗体を作製する場合は、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域 (complementarity determining region ; CDR) をヒト可変領域に移植して、フレームワーク領域(FR)はヒト由来のものを、CDRはマウス由来のものからなる再構成した可変領域を作製する。

次に、これらのヒト型化された再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。最終的に再構成されたヒト型化抗体のヒト以外のアミノ酸配列に由来する部分は、CDR 及び極く一部の FR のみである。CDR は超可変アミノ酸配列により構成されており、これらは種特異的配列を示さないため、マウス CDR を有するヒト型化抗体を使用することが可能である。ヒト型化抗体の作製法は、当分野において周知である。

ヒト抗体は、一般に V 領域の抗原結合部位、すなわち超過変領域(Hyper Variable region)についてはその特異性と結合親和性が問題となるが、構造的にどの動物で作製してもかまわない(マウス、ラット等)。一方、 V 領域のそのほかの部分や定常領域の構造はヒトの抗体と同じ構造をしていることが望ましい。ヒトに共通の遺伝子配列については遺伝子工学的手法によって作成する方法が確立されている。

本発明の抗体のアイソタイプは特に限定されず、例えば、IgG (IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄) 、 IgM、IgA (IgA₁、IgA₂) 、 IgD または IgE の任意のアイソタイプを有することができる。

5 4. 高親和性抗体の利用

本発明の高親和性抗体は、疾患の診断、治療又は予防のための薬剤として有用である。

(1) 疾患の診断

本発明の抗体を用いた各種疾患の診断方法は、各種疾患の疑いのある被験者から採取した検体、例えば血清等と本発明の抗体とを抗原抗体反応によって結合させ、結合した抗体量により検体中の目的とする抗原の量を検出することにより行う。抗体量の検出は、公知の免疫学的測定法に従って行えばよく、例えば、免疫沈降法、免疫凝集法、標識免疫測定法、免疫比ろう法、免疫比濁法等を用いることができる。特に標識免疫測定法が簡便かつ高感度という点で好ましい。標識免疫測定法では、検体中の抗体価は標識抗体を用いて直接検出した標識量で表すほか、既知濃度あるいは既知抗体価の抗体を標準液として用いて相対的に表してもよい。すなわち、標準液と検体を同測定系にて同時に測定し、標準液の値を基準にして検体中の抗体価を相対的に表すことができる。

標識免疫測定法としては、公知の測定法、例えば、ELISA 法、RIA 法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法等を任意に利用することができる。用いる標識物質は、上記測定法に応じて、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、および化学発光化合物等を適宜選択すればよい。前記酵素としては、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等を挙げることができる。上記標識物質はアビジンーピオチン複合体を用いることにより、標識物質の検出感度を向上させることも可能である。また、放射性同位体としては、主に ¹²⁵I が、蛍光化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) やテトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) 等が挙げられる。化学発光化合物としては、ロフィン、ルミノール、ルシゲニン等が挙げら

れる。上記標識物質による抗体の標識は、常法に従って行うことができる。以下、標識抗体を用いた標識免疫測定法について説明する。

標識免疫測定法による、各種疾患を検出する方法としては、公知の非競合反応系あるいは競合反応系を用いて行うことができる。非競合反応系においては、固相が必要である（固相法）。競合反応系においては、必ずしも固相を必要としない（液相法）が、固相を用いた方が、測定操作が簡便になるため好ましい。固相の材質としては、例えば、ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セルロース等が挙げられ、固相の形状としては、球状、ウェル状、チューブ状、シート状等が挙げられるが、これらに限定されず、標識免疫測定法に用いられる公知のものを任意に用いることができる。
10

非競合反応系の場合、測定操作は、検体または本発明の抗体を固相化した後、本発明の抗体または検体と反応させ、次いであらかじめ標識しておいた抗免疫グロブリン抗体（二次抗体）を加えて固相化した検体と反応している抗体と反応させる。この二次抗体の標識により、検体に結合した抗体量を検出することができる。検出された標識化二次抗体の量は、検体中の目的とする抗原の量と正相関するので、これにより検体中の目的とする抗原の量を求めることができる。
15

競合反応系では、一定量の抗体に対して、検体と一定量の目的とする抗原を競合的に結合させる。例えば、検体を固相化した後に、あらかじめ目的とする抗原を添加し反応させた本発明の抗体と反応させる。次に、固相化された検体と反応した抗体を、あらかじめ標識しておいた抗免疫グロブリン抗体（二次抗体）と反応させ、標識物質によって抗体の量を検出することができる。検出される標識量は、添加された目的とする抗原の量と逆相関する。そのほかの競合反応系としては、本発明の抗体を固相化して、これに検体と反応させた後、あらかじめ標識しておいた目的とする抗原を反応させる。検出される標識量は、抗体と結合した検体中の GANP 蛋白質量と逆相関する。
20
25

前記した抗原または抗体の固相化法としては、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法、架橋法等、公知の方法を使用できる。特に、物理的吸着法が簡便という点で好ましい。また、抗免疫グロブリン抗体（二次抗体）としては、例えば、

抗 IgG 抗体、抗 IgM 抗体等を用いることができる。これらの抗体は、抗体分子をそのまま使用してもよいし、あるいは抗体を酵素処理して得られる抗原結合部位を含む抗体フラグメントである Fab、Fab'、F(ab')₂ を使用してもよい。さらに、標識した抗免疫グロブリン抗体の代わりに、抗体分子に特異的な親和性をもつ物質、例えば IgG に特異的な親和性をもつプロテイン A 等を標識して使用してもよい。

前記標識免疫測定法の好適な例として、酵素を標識とした免疫測定法、ELISA 法を挙げることができる。ELISA 法は、例えば、96 穴プレートに検体またはその希釈液を入れて、4 ℃～室温で一晩、または 37℃ で 1～3 時間程度静置して検出すべき GANP 蛋白質を吸着させて固相化する。次に、本発明の抗体を反応させ、次いであらかじめ酵素を結合させた抗免疫グロブリン抗体（二次抗体）を反応させる。最後に酵素と反応する適当な発色性の基質（例えば、酵素がホスファターゼの場合は p-ニトロフェニルリン酸等）を加え、この発色によって抗体を検出する。

また、本発明の高親和性抗体を利用することにより、各種疾患の治療薬の薬効評価を行うことができる。本発明の高親和性抗体を利用した薬効評価方法は、各種疾患患者あるいは各種疾患モデル動物に対して薬剤を投与後、これら生体中のウイルス等の抗原の量を本発明の抗体を用いて検出し、その量を比較することにより、生体中の抗原の量を通して各種疾患の治療薬としての薬効を評価することができる。

本発明の高親和性抗体は、各種疾患診断用キットの形態で提供することができる。該キットは、本発明の診断方法や本発明の薬効評価方法に使用することができる。本発明のキットは以下の(a)及び(b)から選ばれる少なくとも一つ以上を含む。

(a)本発明の抗体またはその標識物
25 (b)前項(a)記載の抗体またはその標識物を固定した固相化試薬

ここで、抗体の標識物とは、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、または化学発光化合物によって標識されたものを意味する。

また本発明のキットにおける抗体、もしくはこれらの標識物を固定する固相の

材質としては、ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セルロース等が挙げられ、固相の形状としては、球状、ウェル状、チューブ状、シート状等が挙げられるが、これらに限定されない。該固相化試薬の代わりに、固相と固相化に必要な固相化試薬を添付したものでもよい。固相化試薬として、例えば物理的吸着による固相化の場合は、50mM 炭酸塩緩衝液 (pH 9.6)、10 mM トリス・塩酸緩衝液(pH8.5、100mM 塩化ナトリウム含有)、PBS 等のコーティング液と、さらに必要に応じてコーティング液に 0.5% のゼラチン等を含有させたブロッキング液が挙げられる。

また、本発明のキットにおける抗体は、PBS 等に溶解させた状態、あるいはゲルに結合させた状態（以下、「吸収用ゲル」と略す）であってもよい。前記吸収用ゲルはさらに適量を、バッチ法による吸収処理用に 0.5～2ml 程度のマイクロ遠沈チューブに予めパッケージングされた状態であってもよく、あるいはカラム法による吸収処理用にカラム容量が 0.1 ～5 ml のミニカラムに予め充填された状態であってもよい。

15 本発明のキットは、上記した構成要素のほか、本発明の検出を実施するための他の試薬、例えば標識物が酵素標識物の場合は、酵素基質（発色性基質等）、酵素基質溶解液、酵素反応停止液、あるいは検体用希釈液等を含んでいてもよい。前記検体用希釈液としては、例えば PBS（生理的リン酸緩衝液、pH7.4）、137mM 塩化ナトリウムおよび 3mM 塩化カリウムを含む pH7.4 かつ 20mM のトリス・塩酸緩衝液（以下、「TBS」と略す）、0.05% Tween20、0.1～1% の BSA を含有させた PBS、あるいは TBS 等を挙げることができる。該検体用希釈液は、検体希釈以外、例えば抗体の希釈等に用いてもよい。

（2）疾患の治療又は予防用医薬組成物

本発明の高親和性抗体は、疾患の病原となる抗原の活性を中和させる作用を有するものであれば、疾患の治療又は予防のための医薬組成物として有用である。本発明の医薬組成物は、本発明の高親和性抗体またはその断片を有効成分として含み、さらに薬学的に許容される担体を含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、增量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、
5 トローチ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびペッサリーなどが含まれる。

10 本発明の薬剤の投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該薬剤に含有される活性成分である高親和性抗体の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき $10\text{ }\mu\text{g}$ から 1000mg 、好ましくは $10\text{ }\mu\text{g}$ から 100mg の範囲で投与することができるが、この範囲に限定されるものではない。

15 例えば、注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の薬学的に許容される担体中に $0.1\text{ }\mu\text{g}$ 抗体/ml 担体～ 10mg 抗体/ml 担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において 1kg 体重あたり、 $1\text{ }\mu\text{g} \sim 100\text{mg}$ の割合で、好ましくは $50\text{ }\mu\text{g} \sim 50\text{mg}$ の割合
20 で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射などが挙げられるが、好ましくは静脈内注射である。また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製
25 することもできる。そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用

することができる。

5. 本発明の応用

本発明者らは、B 細胞腫瘍株に GANP の過剰発現を誘導した上で解析を行った

5 結果、B 細胞腫瘍株は GANP 遺伝子導入によって、飛躍的な V 領域遺伝子の体細胞突然変異誘導効果を有することを示した。この効果は、GANP の RNA プライマーゼ活性に必要な 502 番目のセリンのリン酸化が起こらないような変異遺伝子を用いた場合には見られないことから、V 領域遺伝子の体細胞突然変異の飛躍的な誘導には、RNA プライマーゼ活性が必要であることを示している。この結果
10 は、臨床的な補助免疫賦活剤として、GANP が特異的抗体産生の増強効果を有することを示すものである。

ベクターとしてレトロウイルスベクターを使用し、CD40、BAFF などの TNF ファミリー分子を介する刺激を GANP と併用することも、臨床的な補助免疫賦活作用にとって効果的である。また、この遺伝子導入を骨髄細胞レベルで行うこと
15 によって、T 細胞における高親和性結合の誘導も期待できる。エイズ、C 型肝炎ウイルス、成人 T 細胞白血病、狂牛病などの高親和性抗体が得られない場合や、あるいは得られたとしてもすぐに抗原の変異が起こるために十分に高親和性抗体の産生が持続できない場合には、この遺伝子導入は優れた効果を発揮すると期待できる。

20 本発明の GANP 遺伝子過剰発現哺乳動物は、生物学研究試薬、臨床検査試薬作製に有効なモノクローナル抗体の開発に有効である。例えば、特定のシグナル伝達分子に対するモノクローナル抗体を機能ドメインや機能モチーフに特異的にそして結合力の高い高親和性抗体を簡便に作製することは非常に活用される範囲が広い。多くの抗体はそれほど多くのスクリーニングをかけないため、ウエスタン
25 解析と免疫沈降に用いることができない場合がある。この場合、本発明のトランスジェニック哺乳動物を用いれば、比較的少ないクローンの抗体から高親和性抗体産生細胞を短時間で選別することができ、経費、時間、労力の削減する効果は大きい。特にリン酸化抗体、遺伝子変異部分に対する特異抗体の作製は診断薬、

あるいは抗体を用いた薬物の選択的注入法に応用できる。また遺伝子の配列やヌクレオチド部分に選択的に結合する高親和性抗体の產生も可能となる。

無機物、炭水化物、化学合成物など、任意の物質の立体構造の一部は、抗原モチーフとして認識される。従来には高親和性抗体は得られていないが、自己免疫疾患マウスとの交配で作製されるマウスは、あらゆる抗原に対して高親和性抗体を得るために有効である。この方法で結合力が $10^{-11}M$ オーダーの高親和性抗体ができる可能性があり、ELISA 法の技術開発を導入することにより、微量物質の検出を簡便に行う技術を開発することが可能である。

また、本発明によれば、RNA プライマーゼ不活性型 GANP 遺伝子を含む、アレルギー疾患又は自己免疫疾患のための遺伝子治療剤を提供することも可能である。「RNA プライマーゼ不活性型 GANP 遺伝子」とは、RNA プライマーゼドメイン欠損、又は RNA プライマーゼドメインが変異した遺伝子を意味し、502 番目のセリン残基の変異を含む近傍の遺伝子の変異によって GANP 分子の構造および機能的な変化を生じた遺伝子のことを意味する。

本発明の遺伝子治療剤は、RNA プライマーゼ不活性型 GANP 遺伝子を含む組み換えベクターを、遺伝子治療剤に用いる基剤と一緒に配合することにより製造することができる。組み換えベクターの構築の際に用いるベクターとしては、ウイルスベクターとしてレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターなどが挙げられ、あるいは動物発現用プラスミドを使用することもできる。ベクターは好ましくはウイルスベクターである。RNA プライマーゼ不活性型 GANP 遺伝子をウイルスベクターに組み込んだ場合は、組換え体 DNA を含有するウイルス粒子を調製し、遺伝子治療剤に用いる基剤と一緒に配合することにより遺伝子治療剤を製造することができる。

遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤を使用することができ、例えば、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶

液との混合溶液等が挙げられる。あるいはまた、当業者に既知の常法に従って、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH 調整剤、植物油、もしくは界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製することもできる。これらの注射剤は、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製する

5 こともできる。

本発明の遺伝子治療剤の投与形態としては、通常の静脈内、動脈内等の全身投与でもよいし、局所注射又は経口投与等の局所投与を行ってもよい。本発明の遺伝子治療剤の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、一般に、成人では一日当たり組み換え遺伝子の重量として $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $1000\text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲であり、好ましくは $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲である。投与回数は特に限定されない。

10

実施例

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によ
15 って限定されるものではない。

実施例 1：自己免疫疾患モデル動物における GANP の発現とその機能 (材料及び方法)

1. 動物

NZB、NZW、B/WF1、MRL/lpr、及び BXSB マウスは Japan SLC Co. から購
20 入した。

C57BL/6 及び BALB/c マウスは Charles River Japan から購入した。NOD マ
ウスは大阪大学大学院の宮崎博士から供与された。

2. 抗体及び試薬

マウス B220 (RA3-6B2)、マウス IgM (AM/3) 及びマウス IgD (CS/15) に対するラットモノクローナル抗体はハイブリドーマの培養上清から精製し、D-ビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(Roche diagnostics, Branchburg, NJ) で標識した。ビオチン標識ラット抗マウス Syndecan-1 及び抗マウス CD5 モノク

25

ローナル抗体は購入した (BD PharMingen, San Diego, CA)。ビオチン標識ピーナツアグルチニン(PNA)は Vector Laboratories (Burlingame, CA)から購入した。

5 3. 免疫

トリニトロフェニル-キーホールリンペットヘモシアニン(Trinitrophenyl keyhole limpet hemocyanin (TNP-KLH) 及び TNP-Ficoll は Biosearch Technologies (Novato, CA)から購入した。完全フロイントアジュバンドに乳化した 100 μg の TNP-KLH または PBS 中の 25 μg の TNP-Ficoll をマウスの腹腔内 10 に注入した。14 日後、リンパ器官を取得し、免疫組織分析用に OCT 化合物とともに凍結した。

4. 免疫組織分析

6 μm の凍結切片をアセトンで 5 分間固定し、PBS 中の 3% BSA で 15 分間ブロッキングし、ラット抗マウス GANP モノクローナル抗体(42-23) [Kuwahara K., 他、2000, *Blood* 95: 2321-2328] またはラット抗-pSer⁵⁰² GANP モノクローナル抗体 (PG/103) [Kuwahara K., 他、2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10279-10283]と一緒に 1 時間インキュベートした。切片をのせたスライドグラスを PBS で数回洗浄し、アルカリホスファターゼ (ALP)-結合ヤギ抗ラット IgG 抗体(ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA)と一緒にインキュベートした。発色は Vector Blue kit (Vector)を用いて行った。二重染色のために、反応はビオチン標識抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)-結合ストレプトアビシン (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)を組み合わせて行った。3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド(DAB; 同仁化学)による発色後、25 切片を PBS 中 1% グルタルアルデヒドで 1 分間固定した。Aquatex (Merck, Darmstadt, Germany)をマウンティングのために用いた。インビボで増殖活性のある細胞を検出するために、プロモデオキシウリジン (BrdU) (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO; 1 mg/マウス)を屠殺する 2 時間前に静脈内に注入した。

DNA 合成を行う細胞を抗 BrdU モノクローナル抗体 (BD PharMingen) と ALP-結合ヤギ抗マウス Ig 抗体 (Sigma) とを組み合わせて染色し Vector Red (Vector) により発色させて検出した。PAS 染色は既報の通り行った [Jiang Y.他、1997, *J. Immunol.* 158: 992-997]。

5

5. 結果

(1) MRL/lpr マウスのリンパ節における GANPhⁱ 細胞の出現

GANP 発現は自己免疫傾向の高活性 B 細胞で高発現している。高レベルの GANP を発現するリンパ細胞 (GANPhⁱ 細胞) は、MRL/lpr マウスの末梢リンパ節において非免疫状態において自発的に出現する。

抗 GANP モノクローナル抗体および ALP 結合抗ラット Ig 抗体を用いて、自己免疫疾患モデル MRL/lpr、NZB および正常 C57BL/6 雌マウス由来の膝窩リンパ節について免疫組織化学分析を行った。

結果を図 1 に示す。Vector Blue (ALP 基質) で染色された GANPhⁱ 細胞は 7 週目に MRL/lpr マウスのリンパ節で観察されたのに対し、同年齢の NZB マウスでは観察されず、40 週目に出出現した (図 1)。正常 C57BL/6 マウスでは、極少数の GANPhⁱ 細胞が全期間を通じて観察された。

自己免疫疾患モデルマウスは、C57BL/6 マウスと比較してリンパ細胞の増加は顕著であり、非免疫条件下では GANPhⁱ 細胞は示されない (図 1)。そのような GANPhⁱ 細胞の出現を、加齢の間少しずつ自己免疫状態を引き起こす NZB マウスのリンパ節で調べた。若い NZB マウス (7 週齢) は、膝窩リンパ節に GANPhⁱ 細胞を有さないが、加齢した NZB (40 週齢) は多数の GANPhⁱ 細胞を有した。

GANP RNA プライマーゼ活性は B 細胞の活性化と分化において重要な役割を担っている可能性がある。そこで、NZB マウスで抗 pSer⁵⁰² モノクローナル抗体を用いて、RNA プライマーゼ活性の重要なリン酸化部位である Ser⁵⁰² のリン酸化状態を比較した。

NZB マウスのリンパ節中の GANP および pSer⁵⁰² GANP の発現を比較した。

pSer⁵⁰² GANP は抗 pSer⁵⁰² GANP(PG/103)モノクローナル抗体(青)で検出し、全切片をピオチン標識抗 B220 モノクローナル抗体で染色した後、HRP 結合ストレプトアビジンと DAB(茶色)を組み合わせて検出した。2 回の独立した実験から代表的データを示した(図 2)。

5 図 2において、下段の図(グラフ)は、加齢の間に濾胞外領域の GANPhi(黒の棒)および pSer⁵⁰² GANPhi(斜線の棒)の細胞数を示す。

GANP の発現は 8 週目で顕著であり、GANPhi 細胞が 32 週までの全期間を通じて検出された(図 2; 上図)。対照的に、pSer⁵⁰²-陽性細胞は 8 週目に最大であったが、その後、陽性細胞は顕著に減少した(図 2; 真中の図)。ピーク年齢に基づく顕微鏡観察での反応性細胞数を図に示す(図 2; 下図)。これらの結果から、GANP 発現は最初に RNA プライマーゼ活性を伴うが、この活性は長期間に渡っては調節されていないことが分かる。

15 (2) 自己免疫傾向マウスの脾臓の赤脾髄における GANPhi 細胞の自発的出現

自己免疫傾向 NZB マウスの膝窩リンパ節で検出された GANPhi 細胞が非免疫状況下の脾臓に出現するかどうかを調べた。

免疫染色は前記(1)の操作(図 2)と同様に行った。3 回の独立した実験からの代表的データを示した(図 3)。

20 GANPhi 細胞は 4 週目に脾臓に出現し、細胞数は 12 週目に最大値に達したが、24 週後に消失した(図 3; 上図)。pSer⁵⁰² GANP の発現も 8 週目と 12 週目に検出された(図 3; 真中の図)。赤脾髄の相対細胞数と比較した結果、脾臓に出現した GANPhi 細胞は 12 週後には末梢リンパ節に移動していることが分かる。GANPhi の増加は、自己免疫疾患の発症に先行する自己抗体の産生量に比例している(図 2 及び図 3; Theofilopoulos A.N., 他, 1985, *Adv. Immunol.* 37: 269-390)。

GANPhi 細胞の出現は自己免疫傾向マウスにおける B 細胞の異常と関連している可能性があるので、非免疫条件下で各種の自己免疫傾向マウス(8 週齢)における GANPhi 細胞の出現を調べた。

結果を図4に示す。GANPhⁱ細胞はMRL/lpr、NZB及びB/WF1の赤脾髄で顕著に出現した。

GANPhⁱ細胞の数はSLE・モデルマウスのBXSB及びNODの脾臓にはそれほど増加しなかったが、対照のBALB/cマウス(図4)及びC57BL/6マウス(図5)と比較すれば増加していた。脾臓の切片は、GC様構造としてPNA⁺B細胞の連想又は未熟の会合を示した。GC様領域でのGANPの発現は、正常C57BL/6マウス及びBALB/cマウスに、T細胞依存性抗原(T cell-dependent Ags: TD-Ags)を免疫することによって作製したGCでのGANPの発現と比較して高くない。しかし、GANPhⁱ細胞は、自己免疫傾向マウスの赤脾髄領域で顕著に出現していた(図4)。

さらに、GANPhⁱ細胞集団を、リンパ系細胞のマーカー分析によって解析した。

ビオチン標識抗B220モノクローナル抗体、ビオチン標識抗Syndecan-1モノクローナル抗体、ビオチン標識抗IgMモノクローナル抗体、及び抗IgG抗体を用いて、NZBマウスの脾臓切片について二重染色を行い、GANPhⁱ細胞を同定した。

結果を図5に示す。図5に示すパネルの左の列は、上から下に順にビオチン標識抗IgMモノクローナル抗体、抗IgG抗体、ビオチン標識抗B220モノクローナル抗体及びビオチン標識抗Syndecan-1モノクローナル抗体を用いたときの図である。中央の列は、上記それぞれの抗体を用いたのと同じ切片でのGANPの発現を示す。右の列は左の列と中央の列を重ね合わせた図である。右列の二重に染色された細胞は、GANPhⁱ細胞がB220⁺Syndecan-1⁺IgM⁺であることを示す。GANP発現は、IgM、IgG及びB200の場合は赤色で示し、Syndecan-1の場合は緑色で示す。マーカーは、IgM、IgG及びB200は緑色で示し、Syndecan-1の場合は赤色で示す。

GANPhⁱ細胞はB220⁺Syndecan-1⁺の表現型を発現し、多量のIgMを細胞中に発現する(図5)。CR1、Thy-1、GL-7、CD23及びPNAについては陰性であり、これらの結果から、GANPhⁱ細胞がB系細胞の後期成熟段階、おそらく形質細胞であることが示される。このGANPhⁱ細胞が増殖性形質芽細胞であるかどうかを

調べるために、NZB マウスに BrdU (1 mg／マウス)を投与（静脈内注入）し、インピボで BrdU を取り込ませるために 2 時間インキュベートした。その後、マウスから脾臓切片を調製した。

切片を抗 GANP モノクローナル抗体(青)及び抗 BrdU モノクローナル抗体(赤)
5 で二重染色した。PAS 染色を常法に従って行った。

結果を図 6 に示す。GC は胚中心を示す（左）。GANP 単一陽性 GANPhⁱ 細胞
は矢印で示し、PAS 単一陽性細胞を矢頭で示す（中央）。

また、切片をビオチン標識抗 CD-5 モノクローナル抗体で染色した。PALS 領域は、リンパ節動脈周囲鞘を示す（右）。図 6 は、3 回の独立した実験から代表的
10 データを示した。

GANPhⁱ 細胞は BrdU 取り込みについて陽性ではないことから（図 6）、これらの細胞は増殖性ではなく、形質芽細胞段階より成熟していることが示唆された。

B-1 細胞の異常な分化として、Mott 細胞形成が自己免疫傾向マウスで観察される
15 る。Mott 細胞は形質細胞の異常な形態であり、多量の IgM 分子が、PAS 染色により細胞質内 Russell 小体として検出される粗面小胞体結合小胞に蓄積している [Jiang Y.,他、1997, *J. Immunol.* 158: 992-997]。GANPhⁱ 細胞は PAS-染色で染色されず（図 6）、これにより GANPhⁱ 細胞を B-1 細胞由来形質細胞の Mott 細胞と区別することができる。脾臓 GANPhⁱ 集団は CD5 発現が陰性であり（図 6）、
20 NZB マウス（12 週）から得た腹膜細胞は GANPhⁱ 細胞について陰性であったことから、B-1 細胞は多量の GANP を発現していないことが示される。これらの結果から、GANPhⁱ 細胞は自己免疫状態で高活性の B 細胞に分類され、この集団が B-1 細胞の起源とは異なる起源の系統であることが示唆される。

25 (3) TD-Ag での免疫による正常マウスにおける GANPhⁱ 細胞の誘導

二次リンパ器官における GANPhⁱ 形質細胞の出現が、自己免疫傾向マウスに限られているかどうかを調べた。

雌 C57BL/6 マウス（7 週齢）を、TNP-Ficoll (TI-2-Ag) 又は TNP-KLH (TD-Ag)

で腹腔内免疫し、14 日後に脾臓を得た。TNP-Ficoll で免疫したマウスは、ビオチン標識抗 IgD モノクローナル抗体で対比染色した場合、GANPhi 細胞を赤脾髄領域で示さなかった（図 7 左）。TNP-KLH で免疫したマウスは、GANPhi 細胞の誘導を赤脾髄領域で示した（図 7 右）。図 7において、GANPhi 細胞は矢印で示す。WP は白脾髄領域を示す。

GANPhi 形質細胞集団は、数は非常に少ないが、TD-Ags による免疫によって正常 C57BL/6 及び BALB/c マウスの脾臓においても誘導される（図 7）。T 細胞非依存性 Ag (T cell-independent Ag: TI-Ag) による免疫はそのような細胞の誘導において効果は小さい。GANPhi 細胞集団は B220^{lo}IgM^{hi}IgD^{lo}GL-7^{lo}PNA^{lo} CD5^{lo}CD40^{lo} と同様の表現型を示したが、Syndecan-1⁺を示した。

これらの結果から、自己免疫傾向マウスにおける GANPhi 形質細胞の生成は、TD-Ag に対する免疫応答のために提供されるのと同様の刺激によって誘導されることが示される。GC で増殖と分化を経た Ag 駆動 B 細胞は、GANP を発現しながらより長い間、形質細胞段階として赤脾髄領域に局在化している可能性がある。

実施例 2 : GANP の過剰発現

（方法）

1. Daudi 細胞への安定なトランسفェクション

20 10 μg の線状化した pCXN-2 マウス GANP 又は GANPS/A502 cDNA を Daudi 細胞に、Gene Pulser II (Bio-Rad) を用いてエレクトロポレーションを行った。48 時間後、G418 (Promega; 1 mg/ml) により選択を開始して、マウス GANP を安定に発現する Daudi 細胞を得た。

25 2. Daudi トランسفェクタントの Ig V_H 転写物の分析

全 RNA を全細胞から Trizol (Invitrogen) を用いて抽出した。cDNA を既報の通り取得した (Kuwahara, K. et al., Blood 95, 2321-2328 (2000))。LV_H3-CH1C μ 転写物を以下のプライマー及び反応液を用いて増幅した。増幅は、Pfu Turbo

(Stratagene)を用いた。

5'-LVH3 プライマー : 5'-CTATAACCATGGACCATGGACATACTTGTCC-3'
(配列番号 5)

3'-XbaI·CH1·C μ プライマー :

5 5'-TGCATGCATTCTAGAGTTGCCGTTGGGGTGCTGGAC-3' (配列番号 6)

反応液組成 :

cDNA	0.5 μ l
10x buffer	2.5 μ l
10 mM dNTP mix	0.5 μ l
5'-LVH3 primer (10 μ M)	1 μ l
3'-Xba I·CH1·C μ primer (10 μ M)	1 μ l
Pfu Turbo 0.5 μ l	
dH ₂ O	19.5 μ l

反応条件 :

10 94°C 1 min
[94°C 1 min; 62°C 1 min ; 72°C 1 min] ×35 サイクル
72°C 10 min
4°C

15 PCR 産物を NcoI 及び XbaI で消化し、ゲルで精製し、NcoI·XbaI で消化した
プラスミドとライゲーションした。コンピテント細菌に形質転換後、QIAprep キット(QIAGEN)を用いて調製した少量のプラスミド DNA の塩基配列を自動シーケンサー (Applied Biosystems) により決定した。

3. GANP-トランスジェニック(Tg)マウスの作製

20 導入遺伝子は、pLG ベクターの XhoI サイトに 5.6 kb のマウス GANP 遺伝子を導入して作製した。このベクターはヒト免疫グロブリンイントロンエンハンサー領域 (2 kb EcoRI フラグメント) を持ち、B 細胞での強力な発現を行う、特異的ベクターである。この遺伝子を直線化してマウスに遺伝子導入を行った。マウス GANP 全長 cDNA を含む線状化した pLG vector (Koike, M. et al. Int.

Immunol. 7, 21-30 (1995)) を C57BL/6 マウスの受精卵にマイクロインジェクションした。マウスの尾のゲノム DNA および以下のプライマー及び反応液を用いて導入遺伝子の存在についてスクリーニングした。

1-5' プライマー : 5'-TCCCGCCTTCCAGCT GTGAC-3' (配列番号 7)

5 1-3' プライマー : 5'-GTGCTGCTGTGTTATGTCCT-3' (配列番号 8)

反応液組成 :

DNA (50 ng/ μ l)	1 μ l
10x buffer	2.0 μ l
2.5 mM dNTP mix	2.0 μ l
1-5' primer (10 μ M)	0.8 μ l
1-3' primer (10 μ M)	0.8 μ l
Z-Taq DNA polymerase	0.1 μ l
dH ₂ O	13.3 μ l

反応条件 :

10 [98°C 5 sec; 59°C 5 sec; 72°C 10 sec] ×35 サイクル
4°C

4. RT-PCR

全 RNA は、脾臓又は脾臓 B 細胞から Trizol(Invitrogen)を用いて抽出し、

RT-PCR は、2 種のプライマー 1-5' 及び 1-3' を用いて行い、cDNA を合成した
15 (Kuwahara, K. et al., Blood 95, 2321-2328 (2000))。GANP 転写物はアガロースゲル電気泳動により検出した。β-アクチン転写物は対照として用いた。

5. 結果

(1) Daudi 細胞にマウス GANP を安定的に発現させたトランスフェクタントの V 領域遺伝子の体細胞突然変異 (SHM)

GANP 遺伝子を、インビトロで SHM の分析に使用される各種ヒト B リンパ球細胞に導入した (Rogozin, I. B., et al., Nat. Immunol. 2, 530-536 (2001); Kuwahara, K. et al., Blood 95, 2321-2328 (2000); 及び Denepoux, S. et al., Immunity 6, 35-46 (1997))。多くの B 細胞株にはトランスフェクションできな

かつたが、維持中は SHM を通常は生成しない AID を発現する Daudi B 細胞には GANP 遺伝子を導入できた。

このクローンは、野生型及び偽トランスフェクションした細胞と比較して高頻度の SHM ($5 \times 10^{-4}/\text{bp}$)を V 領域で示した。

5 $V_{H3}\text{-}C_{H1}C\mu$ の断片を PCR で増幅してプラスミドにサブクローニングし、シークエンスした。

体細胞変異の模式図を図 8 A～C に示す。縦線（「|」）はサイレントミューテーション（アミノ酸が変わらない）、もう一つの記号（縦線に●印を付したもの）にはアミノ酸が置換している変異を示す。Daudi/mock ではほとんど変異が入っていながら、Daudi/GANP-14, 15, 17, 21 の 4 クローンは、程度の差はあるが変異を多く認める。DNA プライマーゼ活性の制御に関する 502 番目のセリンをアラニンに置換した変異体 (GANP S/A)を導入したトランスフェクタントでは変異の入る効率が減少する。

SHM は、定常領域遺伝子には誘導されなかった（図 8 A～C）。GANP の RNA 15 プライマーゼ活性は S502 でのリン酸化により調節され、これは特異的モノクローナル抗体により検出できる (Kuwahara, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10279-10283 (2001))。インビトロ及びインビボでの B 細胞の刺激は共に S502 のリン酸化を誘導するので (Kuwahara, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10279-10283 (2001))、このリン酸化が Daudi B 細胞での SHM の生成に関与するかどうかを調べた。

非リン酸化 GANP 変異体(GANP-S502A)を導入した場合、SHM は誘発されなかったことから（図 8 A）、S502 のリン酸化が、GC-B 細胞での SHM の生成に重要であることが示唆された。

25 (2) B 細胞で GANP を過剰発現させたトランスジェニックマウス

免疫応答における GANP の関与を調べるために、ヒト Ig エンハンサー及びプロモーターの制御下にマウス GANP を過剰発現させた GANP-トランスジェニック (Tg)マウスを作製した（図 9 A 及び B）。GANP mRNA の発現の亢進は、

RT-PCR で確認した。

このマウスは、B 細胞で GANP の発現の増加を示し（図 9 C）、骨髓、脾臓及びリンパ節の細胞の表層マーカー分析において、B 系細胞の通常の分化を示した。

SHM における GANP のインビオでの役割を調べるために、TD-Ag である

5 NP-CG の免疫後における V_H186.2 領域について調べた。すなわち、GANP 過剰発現トランスジェニック（Tg）マウスに 50 μg の NP-CG を 2 週間おきに 3 回免疫して、V_H186.2 を PCR で增幅し、体細胞突然変異を解析した。

結果を図 10 に示す。変異の数は Tg でやや増加しているが、高親和性を示す 33 番目の W が L に変わる変異（SHM）は、Tg で約 3 倍に増加していた。なお、

10 CDR は相補鎖決定領域を示す。

V_H186.2 ローカスは、高親和性 IgG(γ1λ1)NP-応答について特有のパターンの SHM を示す。NP-CG での免疫後における全脾臓 B 細胞の配列分析により、野生型マウスと比較して GANP-Tg マウスでは SHM の頻度が僅かに増加していることが示された（図 10）。

15 この変異は、ハプテン特異的 B 細胞の親和性成熟に重要であることが以前に示されている（Allen, D. et al., EMBO J. 1995-2001 (1988)）。

実施例 3：B 細胞特異的 GANP 欠損マウス(B-GANP-/-マウス)の作製

20 （方法）

1. CD19-Cre/+GANP flox マウスの樹立

GANP ゲノム DNA を用いて、エクソン II の下流にネオマイシン耐性遺伝子（neo）を挿入することによってターゲッティングベクターを調製した。loxP 部位は、neo の 3' 側の隣接領域とエクソン I 及び II の間のイントロンに導入した。

25 つまり、エクソン II を loxP 配列で挿んだ flox マウスを作製し、これと CD19-Cre マウスとを交配させて、B 細胞で GANP が欠損するマウスを樹立した（図 11A 及び B）。

直線化したターゲッティングベクターを TT2 ES 細胞（Yagi, T. et al. Anal.

Biochem. 214, 70-76 (1993)) にエレクトロポレーションによりトランスフェクションした。G418 で選択後、ES コロニーを拾い上げ、プロテナーゼ K と一緒にインキュベートした。相同組換え体を下記 neo2 プライマー及び CGK3'-2 プライマーによりスクリーニングした。

5 neo2 プライマー : 5'-GCCTGCTTGCAGAATATCATGGTGGAAAAT-3' (配列番号 9)

CGK3'-2 プライマー : 5'-GGCACCAAGCATGCACGGAGTACACAGA-3' (配列番号 10)

相同組み換えは、BamHI で消化した ES クローンの DNA をプロープ A を用いてサザンプロット分析することにより確認した。4kb のバンドを示す 3 個の陽性クローンを用いて、ICR 胚盤胞へのマイクロインジェクションによりキメラ初代マウスを作製した。なお、B 細胞で GANP の発現が見られないことは、サザンプロッティング、RT-PCR と細胞染色で確認した (図 11C、D 及び E)。

GANP flox/+ マウスは少なくとも 10 回、C57BL/6 マウスと戻し交配した。B 15 細胞における GANP 遺伝子を欠失させるために、GANP-floxed マウスと CD19-Cre ノックインマウス (Rickert, R. C., et al., Nucleic Acids Res. 25, 1317-1318 (1997)) とを交配した。

2. FACS 分析

20 リンパ器官由来の単一細胞懸濁物を、各ビオチン標識モノクローナル抗体により氷上で 1 時間染色した。染色バッファーで洗浄後、細胞を FITC 結合ストレプトアビシン (Amersham Bioscience) 及び PE 結合モノクローナル抗体で 1 時間インキュベートした。リンパ細胞を、CellQuest ソフトウェアを用いて FACScan (Becton Dickinson) により分析した。

25

3. B 細胞の精製

脾臓細胞を Cre-flox/+ マウス及び B-GANP/+ マウス (7 から 8 週齢) から単離し、0.15 M 塩化アンモニウム緩衝液で処理して赤血球を除いた。プラスチック皿上

で 37°C で 30 分間インキュベーションした後、未接着細胞をリンパ球として回収し、T 細胞を Dynabeads-anti-mouse Thy1.2 モノクローナル抗体(Dynal)を添付のプロトコールに従って使用して除去した。B 細胞の純度(90%以上)を FITC 結合抗 B220 モノクローナル抗体(BD Pharmingen)を用いた細胞表層染色により確
5 認した。

4. インビトロ増殖アッセイ

精製した B 細胞を、10%熱不働化 FCS(JRH Biosciences)、2 mM の L-グルタ
ミン及び 5×10^{-5} M の 2-メルカプトエタノールを含む RPMI-1640 培地(分裂促
10 進剤を含むものと含まないもの)において、96 穴マイクロタイプレートで
 2×10^5 細胞／ウェルで 48 時間インキュベートした。細胞を、 $0.2 \mu\text{Ci}/\text{ウェル}$ の
[³H]-チミジン(ICN)で 16 時間パルスしてから回収し、取り込まれた放射活性をシ
ンチレーションカウンターで測定した。

分裂促進剤は、アフィニティー精製したヤギ抗マウス μ 鎖特異的抗体(10μ
15 g/ml)[F(ab')₂] (ICN)、ラット抗マウス CD40 モノクローナル抗体(LB429; 10μ
g/ml)及び LPS(Sigma; $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)を用いた。

5. 抗原及び免疫

TNP-KLH、TNP-Ficoll 及びニトロフェニル-ニワトリアグロプリン(NP-CG)
20 (23:1)は、Biosearch Technologies から購入した。 $50 \mu\text{g}$ の TNP-KLH 及び NP-CG
(アルミニウムで沈殿)、又は $25 \mu\text{g}$ の TNP-Ficoll (PBS に溶解) を Cre-flo+/+
マウス及び B-GANP-/-マウスの腹腔内に注入した。

6. 抗原特異的抗体産生の測定

25 抗原投与の 10 日後と 14 日後に、免疫したマウスから血清を回収した。 $5 \mu\text{g}/$
ウェルの TNP-BSA (Biosearch Technology) を ELISA プレートに被覆した。各
ウェルを PBS 中の 3% BSA でブッロキングし、段階希釈した血清とインキュベ
ートした。PBS-0.1% Tween 20 で洗浄後、ウェルをピオチン結合 isotype 特異的

モノクローナル抗体及びアルカリホスファターゼ(ALP)結合ストレプトアビジン(Southern Biotechnology)とともにインキュベートした。発色は基質の存在下で行った。

血清中の NP 結合抗体の親和性を求めるために、NP2 結合抗体の NP25 結合抗体に対する割合を、被覆抗原に NP2-BSA (1 分子あたり 2 個の NP が BSA に結合したもの) 及び NP25-BSA (1 分子あたり 25 個の NP が BSA に結合したもの)(Biosearch Technology)を用いたディファレンシャル ELISA により計算した。

7. 免疫組織化学

10 免疫したマウスからの $8\text{ }\mu\text{m}$ の脾臓切片をアセトンで軽く固定した。サンプルを PBS-Tween 20 中の 3% BSA でプロックし、抗 IgD モノクローナル抗体及び ALP-結合抗ラット IgG(ICN)抗体とともにインキュベートした。第一の発色は Vector Blue キット(Vector)を用いて行った。第二の発色は、サンプルをビオチン結合ピーナッツアグルチニン(PNA)(Vecor)及び西洋わさびペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(Kirkegaard & Perry)とともにインキュベートし、次に 3,3'-ジアミノベンジジンテトラ塩酸塩(Dojindo)とともにインキュベートした。PBS 中の 1% グルタルアルデヒドを用いてサンプルを固定した後、Aquatex(Merck)によりマウンティングを行った。

20 8. V_H186.2 遺伝子の配列分析

NP-CG で免疫した Cre-flox/+ 及び B-GANP-/- マウスからの NP-結合 IgG1^{dull}CD38^{low} B 細胞を、(4-ヒドロキシ-5-ヨード-3-ニトロフェニル)アセチル(NIP)を用いて FACS Vantage (Becton Dickinson Biosciences)で分画し、プロテナーゼ K と一緒に 37°C で一晩インキュベートした。ライセートを用いて、PCR を既報の通り (Takahashi, Y., et al. Immunity 14, 181-192 (2001)) 2 回実施した。V_H186.2 遺伝子 DNA を pBluescript にライゲーションし、自動シークエンサーにより配列を決定した。

9. アポトーシス細胞の検出

Cre-flox/+及び B-GANP-/マウスから精製した B 細胞を 40 時間、種々の試薬で刺激した(Watanabe, N. et al. (1998) Scand. J. Immunol. 47, 541-547)。AICD には、24 ウエルプレートに抗 μ 抗体(50 μ g/ml)を固定した。そのほかの場合には、

5 精製した B 細胞を種々の刺激物質で 48 時間刺激し、続いて抗 Fas モノクローナル抗体(Jo2;BD Pharmingen)で 4 時間インキュベートした(Wang, J. et al. (1996) J. Exp. Med. 184, 831-838)。細胞を、プロピジウムアイオダイド(PI)溶液(50 μ g/ml PI, 0.1% Triton X-100, 0.1% クエン酸ナトリウム)を用い、室温で 1 時間インキュベートし、アポトーシス細胞(%)を FACScan で G1 以下領域として
10 計算した。なお、アポトーシス細胞は、トリパンブルーによる染色後、顕微鏡下での確認も行った。

10. TUNEL アッセイ

Cre-flox/+及び B-GANP-/マウスを SRBC(ヒツジ赤血球細胞)で免役した後、それぞれの脾臓切片を調製し、PBS 中の 4%パラホルムアルデヒドで凍結切片を固定した。切片サンプルを、MEBSTAIN Apoptosis Kit II(MBL)で処理し、PI で対比染色した。TdT 媒介 dUTP-ビオチンニック-エンド標識 (TUNEL) アッセイと共に行う実験用に、切片は抗 IgG₁ モノクローナル抗体(BD Pharmingen)及び Alexa546-結合ヤギ抗ラット IgG 抗体(Molecular Probes)を用いた染色も行った。
20 陽性シグナルを検出し、結果を蛍光顕微鏡(BX51; Olympus)により確認した。

11. 結果

(1) RNA プライマーゼ GANP の役割

RNA プライマーゼ GANP の役割を調べるために、Cre-loxP システムを用いて CD19⁺ B 細胞にして GANP 遺伝子を欠失させた B-GANP-/マウスを作製した(図 11A 及び B)。B-GANP-/マウス遺伝子は、エクソン II をほとんど欠損していた(図 11C)。B-GANP-/細胞は GANP mRNA を発現せず(図 11D)、また免疫染色によればタンパク質をほとんど発現しなかった(図 11E)。B-GANP-/マウスは正常に成

育し、骨髓、脾臓、胸腺、リンパ節で正常な数のリンパ細胞を示した。フローサイトメトリー分析では、B-GANP^{-/-}は、骨髓、脾臓及びリンパ節の細胞上に、対照である Cre-flox/+マウスと同様の表面マーカープロフィールを示し(図 12)、Cre-flox/+ (対照) と差はなかった。

5 B-GANP^{-/-}のリンパ節では、sIgM^{low}sIgD^{high} を発現する成熟B細胞(IgM⁺IgD⁺) の数が減少していた。B-GANP^{-/-}マウス由来の B 細胞は、インピトロで抗μ抗体、抗μ抗体+抗 CD40 モノクローナル抗体、またはリポ多糖による刺激後に通常の増殖応答を示した (図 13 : B-GANP^{-/-}は白の棒、Cre-flox/+は黒の棒)。一方、B-GANP^{-/-}マウス由来の B 細胞は、抗 CD40 モノクローナル抗体(5, 10 μg/mL)

10 による刺激後に増殖活性が低下した (図 13)。このことは、B-GANP^{-/-}マウスの B 細胞の増殖では、CD40/CD145 相互作用への反応がわずかに損なわれていることを示す。血清 Ig 量は Cre-flox/+マウスと同様であった (図 14)。

(2) B-GANP^{-/-}マウスにおける抗原特異的抗体産生

15 TI-Ag 及び TD-Ag による免疫後の B-GANP^{-/-}マウスの免疫応答を調べた。TI 抗原であるトリニトロフェニル(TNP)-Ficoll を免疫して 14 日後に、抗 TNP 抗体価を ELISA で測定した。その結果、(TNP)-Ficoll は B-GANP^{-/-}マウス及び Cre-flox/+マウスにおいて同様の応答を誘導し、特に差はなかった (図 15)。

20 胚中心(GC)形成を調べてみると、TD-Ag である TNP-keyhole limpet hemocyanin (KLH)及び NP-CG などの TD-Ags に応答して、変異体マウスは Cre-flox/+マウスと比べて遅延した GC 形成を示した。

GC 形成のピーク応答については、Cre-flox/+は、10 日目に GC-B 細胞のマークターであるピーナツアグルチニンで染色された大きな成熟した GC を示した (図 16 の矢印)。免疫後 10 日では B-GANP^{-/-}の方が GC 形成がやや少なかった。

25 しかし、14 日後では Cre-flox/+に比べて B-GANP^{-/-}の方が数が多くなっており、20 日後でも GC 形成が遅延していた (図 16 の矢印)。

B-GANP^{-/-}マウスは 14 日目に GC の明白な形成を示したので、抗原特異的抗体応答を測定した (図 17)。TD 抗原である TNP-KLH による免疫では、B-GANP^{-/-}

マウスは 10 日目まで明確な GC を示さず、抗体価はほとんど差がなかったが、TNP-KLH による免疫後の 14 日目には、B-GANP^{-/-}で GC の段階的な増加と拡大を示した(図 17)。変異体マウスは TNP-KLH に対して Cre-flox/+マウスと同様の抗体応答を示した。

5

(3) B-GANP^{-/-}マウスにおける親和性成熟の障害

B-GANP^{-/-}マウスにおける GC の特徴(抗体応答が低親和性であること)をさらに調べるために、抗原特異的 IgG1⁺ GC-B 細胞を NP-CG による免疫後に調べた。

異なる分子量を有する NP のハプテン/タンパク質コンジュゲートを用いたディファレンシャル ELISA により、マルチハプテン NP25·BSA コンジュゲートに対する応答と比較した。

B-GANP^{-/-}マウスにおいて、NP2·BSA コンジュゲートに対する抗体応答は、NP-CG 免疫後 35 日目において低親和性(13%)であった。この値は、Cre-flox/+マウスの値(42%)と比較して抗体反応は著しく減少していた(図 18)。

また、図 19 に示す通り、NP 特異的 IgG1^{dull}CD38^{low} B 細胞は B-GANP^{-/-}マウスでは著しく減少した。すなわち、免疫後 10 日目において、Cre-flox/+マウスでは 1,164 細胞/10⁶ 細胞であるのに対し、B-GANP^{-/-}マウスでは 88 細胞/10⁶ 細胞であった。また、14 日目においては、Cre-flox/+が 879 細胞に対し、B-GANP^{-/-}は 83 細胞であった。なお、この傾向は 20 日目も同様であった。

対照的に、IgG1^{high}CD38^{high} メモリー B 細胞は減少しなかった。これらの結果は、GANP の無発現変異は IgG1^{high}CD38^{low} GC-B 細胞段階で B 細胞の分化に欠陥を生じさせていることを示す。

B-GANP^{-/-}マウスにおける抗体の親和性成熟の減少を確認するため、NP-CG で免疫した後の脾臓 B 細胞の V_H186.2 領域の配列を調べた。

SHM は B 細胞分化のこの段階で生じるため、V_H186.2 ローカスの SHM について各種の精製した B 細胞を調べた。なお、V_H186.2 ローカスは、高親和性 IgG(γ1λ1) NP 応答のために利用されている(Cumano, A. & Rajewsky, K. (1985)

Eur. J. Immunol. 15, 512-520)。IgM ローカスは Cre-flox/+ と比較して差異がなかった。

次に、Cre-flox/+ 又は B-GANP^{-/-} に NP-CG を免疫し、NP・結合 IgG₁ 弱陽性 CD38 弱陽性を示す GC-B 細胞 (Ag・結合 IgG₁ B 細胞) についてソーティングした (図 19)。また、ソーティング後の細胞からゲノム DNA を抽出し、V_H186.2 を PCR で増幅し、シークエンス解析を行い、V_H186.2 の配列を比較した (図 20 A～L)。図 20A～F は Cre-flox/+ の V_H186.2 の配列を、図 20G～L は B-GANP^{-/-} の V_H186.2 の配列を比較したものである。

B-GANP^{-/-} マウスにおいて、IgV 領域配列の全体の変異は 14×10^{-3} であり、Cre-flox/+ マウス (21×10^{-3}) と比較して変異の数が減少していた (図 21)。さらに、W33 から L への高親和性型の変異 (33 番目のアミノ酸残基トリプトファンからリシンへの変異、C57BL/6 マウスで顕著に見られる) は 13% (2/15 V 領域) であり、変異型マウスでは、Cre-flox/+ マウスの値 (71%, 10/14 V 領域) と比較してより顕著に減少し、親和性は 1/3 に低下した (図 22)。

以上の結果より、GANP は抗体の親和性の成熟に必須であることが示された。

(4) B-GANP^{-/-} マウス B 細胞におけるアポトーシスからの保護機能

B-GANP^{-/-} マウスにおいて、高親和性抗体の產生が減少するのは、抗原刺激後の B 細胞が不安定であるためであると考えられる。そこで、B 細胞の感受性を調べるため、*in vitro* での B 細胞のアポトーシスを検討した。

正常な B 細胞は、強力に架橋した B 細胞抗原受容体により活性化誘導細胞死 (AICD) が誘導され、AICD は、CD40 の刺激によって阻止された。B-GANP^{-/-} B 細胞では、AICD の刺激に対する感受性は正常 B 細胞 (対照) と同程度であったが、抗 CD40 を介するアポトーシスの抑制の程度については、Cre-flox/+ 対照 B 細胞よりも劣っていた (図 23)。このことは、B-GANP^{-/-} マウスは、GC 形成期の間、抗原反応性 B 細胞の保護機能に欠けることを示す。

GC では、抗原刺激された B 細胞と CD40/CD154 との相互作用によって Fas/CD95 の表面発現が誘導され、Fas 誘導性アポトーシスに感受性を持つよう

になる。そこで、本発明者は、*in vitro*においてアポトーシスを誘導する抗 CD95 刺激に対する B-GANP^{-/-}B 細胞の感受性を測定した。

まず、脾臓 B 細胞を抗 CD40 モノクローナル抗体(LB429)、抗 μ 抗体 + 抗 CD40 モノクローナル抗体、IL-4+抗 CD40 モノクローナル抗体、及び抗 μ 抗体 + IL-4+ 5 抗 CD40 モノクローナル抗体で 48 時間刺激し、次に抗 CD95 モノクローナル抗体を培地に添加した。

その結果、B-GANP^{-/-}マウスの B 細胞のアポトーシス応答は、Cre-flox/+マウスの B 細胞の応答と同様であり、B-GANP^{-/-}マウス及び Cre-flox/+マウスでは差がなかった（図 24）。

10 上記の通り、抗 CD40(LB429)処理後に抗 CD95 で刺激しても、発現誘導は、B-GANP^{-/-}マウス及び Cre-flox/+マウスでは差がなかった。このことは、B-GANP^{-/-}マウスの B 細胞においては、*in vivo* で GC-B 細胞により通常受けるアポトーシス刺激に対して感受性を有することを示す。そこで、TUNEL アッセイを、TD-Ag として SRBC を用いて免疫した後の組織切片について行った。

15 その結果、TUNEL 陽性細胞は、B-GANP^{-/-}マウスの GC 領域において増加しており、ほとんどの細胞は、IgG1 を発現することも示された（図 25、26）。これらの結果は、B-GANP^{-/-}マウスのアポトーシス細胞は、ほとんどが GC-B 細胞であることが示された（図 25、26）。

20 次に、種々の悪性リンパ腫細胞及び正常 B 細胞の CD40 媒介性アポトーシス抑制に必要な分子であると認識されている Bcl-2 ファミリーメンバーの RNA 発現を検討した。

抗 μ 抗体 + IL-4 で刺激すると、Cre-flox/+ B 細胞における bcl-2 の転写の明らかな増加を誘導し、抗 CD40 mAb はその発現をさらにアップレギュレートした（図 27）。また、B-GANP^{-/-} B 細胞については、抗 μ 抗体による bcl-2 転写物と同様のアップレギュレーションを示したが、抗 CD40 mAb(抗 CD40 mAb 単独又は抗 μ Ab + IL-4 + 抗 CD40 mAb)に対する応答は、Cre-flox/+の B 細胞ほど高くはなかった（図 27）。すなわち、アポトーシス抑制に関する Bcl-2 ファミリーの RNA 発現レベルは、抗 CD40 抗体で刺激したときの B-GANP^{-/-}マウス B 細胞において、

対照よりも低下していた(図27)。

変異B細胞中の*bcl-XL*、*bax*及び*bad*については、Cre-flox/+B細胞のレベルと同程度であった(図27)。

以上の結果は、GANPは、GC-B細胞においてCD-40を介したBcl-2の誘導に

5 関する情報伝達を制御しており、*in vivo*での高親和性BCR+ B細胞の生存に大きく寄与していることを示す。

(5) まとめ

B-GANP-/-マウス及びGANP-Tgマウスの結果は、GANPがTD-Agによる免

10 疫後における高親和性B細胞の生成に関与していることを実証している。GANPの役割としては、GC-B細胞でDNAポリメラーゼの効率的なリクルートと調節を仲介している可能性がある。V領域SHMを有するGC-B細胞が高親和性BCRを取得すると、それらは選択されるべきであり、そしてさらにB細胞のV領域のSHMは抑制されて、インビボで高親和性抗体の產生が保証されるはずである。

15 GC-B細胞でのAIDの発現はDNA変異を絶えず生成する可能性があるため、AID活性の調節がB細胞での高親和性BCRを維持するために必要であるかもしれない。B-GANP-/-マウスでの結果から、GANPがSHMプロセスに必要であることが示される。

20 実施例4：GANPトランスジェニックマウスを用いた高親和性抗体の產生

1. ディファレンシャルELISAによる抗体価の比較

野生型(WT)マウスとGANPトランスジェニック(Tg)マウスの2匹ずつにNP-CG 100 μgを免疫し、28日後の血清を取り、ELISAを行った。20 μg/mlのNP2-BSAとNP17-BSAをELISAプレートに4℃で1晩コーティングした。

25 3% BSA/PBS-0.1%Tween20で1時間ブロックし、血清を1時間反応させた。PBS-0.1%Tween20で3回洗い、ピオチン標識抗マウスIgG₁抗体(Southern Biotechnology)で1時間反応させた。PBS-0.1%Tween20で3回洗い、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビシン(Southern Biotechnology)で30分反応

させた。PBS-0.1%Tween20で3回、TBSで1回洗い、p-Nitrophenyl phosphateを基質として発色させた。吸光度を405nmで測定した。

結果を図28に示す。図28の結果から、GANPトランスジェニックマウスを使用することにより高親和性抗体が産生されることが分かる。

5

2. ELISA及びBiacoreを用いた抗原-抗体結合親和性解析

野生型(WT)マウスとGANPトランスジェニック(Tg)マウスに、免疫抗原としてNP-CGを免疫し、それぞれのマウスを用いて細胞融合を行い、得られた陽性ハイブリドーマの培養上清において、ELISA法及びBiacoreを用いて抗原と反応する抗体の結合曲線を得た。得られた結合曲線から、Tgマウスの有用性を導いた。

(1) 材料

(a) 動物

野生型(WT)マウスとGANPトランスジェニック(Tg)マウス。

(b) 抗体及び試薬

NP16-CG(一分子あたり16個のNPがCGニワトリイムノグロブリンに結合したもの)、NP2-BSA(一分子あたり2個のNPがBSA(牛血清アルブミン)に結合したもの)、NP17-BSA(一分子あたり17個のNPがBSAに結合したもの)、HRP標識抗マウスIgG、IgA及びIgMを用いた。

20

(2) 方法及び結果

野生型(WT)マウスとGANPトランスジェニック(Tg)マウスの各5匹に、免疫抗原としてNP16-CGを、2週間をおきに3回免疫し、3回免疫後に採血し、抗血清を用いて抗体価の比較をしたところ、前記1項に記載の結果と同様にGANP-Tgマウスの有用性が確認された。

25

この中から、力価の高いマウスの脾細胞を用いて、P3U1ミエローマ細胞と細胞融合を実施し、GANP-Tgマウスの脾細胞数(6.0×10^7 個)、WTの脾細胞数(4.8×10^7)に基づき、 1×10^6 /ウェルになるようにまきこみ、GANP-Tgマウス由來の細胞は600クローン、WTマウス由來の細胞は480クローンをHAT培地にて

培養した。

HAT 培養 9 日後の培養上清を用いて、NP2·BSA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を固相化抗原として ELISA 法を実施した。GANP-Tg マウスおよび WT マウスの培養上清のそれぞれから、ELISA 吸光度結果において高親和性抗体の產生を示す上位 2.5% の

5 クローンを選出し、HT 培地にてクローニングを実施した。

HT 培養 9 日後の培養上清を用いて、NP2·BSA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を固相化抗原として ELISA 法を実施した結果、GANP-Tg は 6 クローン(クローン名: G2·6, G2·9, G2·12, G2·14, G2·15, G2·16)、WT は 1 クローン (クローン名: W2·7) のハイブリドーマを樹立した。

10 GANP-Tg マウス、WT マウスのそれぞれのクローンを RPMI 培地にて培養し、以下の実験に用いるのに適した培養上清を 1 mL ずつ確保した。この培養上清を用いて、以下の評価検討を実施した。

(a) ELISA 法

15 抗体価を評価するにあたり、抗原の性質の異なるもの、いわゆる、CG 一分子あたり NP 含有率の異なる物質を用いて、その ELISA 反応性の比率をもって評価した。

本法は、NP の親和性を測るのに有用な測定法であり、簡便で多くの検査をすることができるので、一次スクリーニングとして適当で信頼できるものである。

20 まず、NP2·BSA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と NP17·BSA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をそれぞれ固相化抗原として用い、4 °C で一晩固相化した。固相化プレートを PBS·Tween20 で洗浄した後、スキムミルク PBS·Tween20 にてプロッキングを実施した。さらにプレートを PBS·Tween20 で洗浄した後、GANP-Tg マウスの 6 クローン (クローン名: G2·6, G2·9, G2·12, G2·14, G2·15, G2·16) 及び WT マウスの 1 クローン (クローン名: W2·7) の RPMI 培養上清 (原液~256 倍希釈液) を用いて、室温で 1 時間固相化抗原と反応させた。次に、プレートを PBS·Tween20 で洗浄した後、HRP 標識抗マウス IgG、IgA 及び IgM を室温で 1 時間反応させた。さらに、プレートを PBS·Tween20 で洗浄した後、オルトフェニレンジアミン(OPD)

にて5分間発色し、2N硫酸を用いて反応を停止した。

吸光度は、ELISA READERを用いて、490nmにて測定した。

ELISAの結果を図29に示す。図29の結果よりGANP-Tgマウスを使用することにより、高親和性抗体が產生されることがわかる。

5

(b) Biacoreを用いた高親和性解析

上記ELISAの結果で、一番親和性の高いと予想されるクローンについて、Biacoreを用いて物理化学的結合能を調べた。

Biacoreによる解析は、NP2-BSA(1 μ g/mL)をリガンドとしてBiacoreチップに結合させたものに、アナライト溶液として一番親和性の高いと思われるTg(G2-9)、一番低いと思われるTg(G2-15)、及びWT(W2-7)の3クローンのRPMI培養上清を用いて、それぞれの結合速度定数(k_{ass})、解離速度定数(k_{diss})、及び親和性の指標となる解離定数KD($KD = k_{diss}/k_{ass}$)を算出した。KDが小さい程、親和性は高いと評価される。

15 その結果として、G2-9(ELISA: 82.9% NP2/NP17比)のビアコアのパターンを図30に示す。図30に示す曲線(a)～(e)は、抗体濃度がそれぞれ26.6、13.3、6.65、3.33及び1.66nMのものである。上記結果から、結合速度定数(k_{ass})= 1.48×10^5 、解離速度定数(k_{diss})= 9.63×10^{-4} 、そして親和性の指標となる解離定数は、KD($KD = k_{diss}/k_{ass}$)= 6.50×10^{-9} となった。

20 一方、ELISAの結果から比較的親和性の低いと予想されるG2-15(ELISA: 33.9% NP2/NP17比)のビアコアのパターンを図31に示す。図31に示す曲線(a)～(e)は、抗体濃度がそれぞれ23.0、11.5、5.75、2.88及び1.44nMのものである。

結合速度定数(k_{ass})= 5.33×10^4 、解離速度定数(k_{diss})= 1.56×10^{-2} 、そして親和性の指標となる解離定数は、KD($KD = k_{diss}/k_{ass}$)= 2.92×10^{-7} となった。この値は、ELISA法でも同等の親和性を示すW2-7(ELISA: 31.6% NP2/NP17比)の活性を持つKD値= 1.67×10^{-7} と近似していた。

以上をもって、GANPトランスジェニック(Tg)マウスを使用することにより、高親和性抗体が产生されることが明らかである。

実施例 5 : GANP と MCM3 の会合、細胞周期中の核／細胞質間の移動

1. 概要

本実施例では、本発明者は部分切断型の変異体 GANP を用いることによって

5 GANP の MCM3 結合領域を決定し、GANP 特異的な領域における 502 番目のアミノ酸のリン酸化セリン(pSer⁵⁰²)に対する特異的なモノクローナル抗体を用いて NIH-3T3 細胞における GANP の局在を特徴づけた。

プライマーゼと MCM との結合は、一つの連動した機能であり、両者が結合した分子複合体は DNA を二重鎖から解く作用を有する。従って、GANP 部分断片 10 が MCM と結合すれば、当該 GANP 断片もプライマーゼ活性を発揮し、高親和性抗体の產生作用を有するものと考えられる。

そこで、GANP 及びその部分断片、Map80 及び MCM3 の核／細胞質区画の局在を、cDNA トランスフェクションと細胞融合実験を用いて解析した。

得られたデータから、GANP は MCM3 と結合することが示され、さらに、GANP 15 の局在は MCM3 の発現によって影響されることが示された。GANP は Map80 の結合機序とは異なる結合機序によって MCM3 と会合する。これらの結果は、MCM3 に結合した GANP は、Map80/MCM3AP の機能とは異なる独特の機能を介することを示す。

20 2. 材料および方法

2. 1. 細胞および細胞培養

NIH-3T3、COS7、HeLa および Swiss-3T3 細胞を、10%熱不活化 FCS (大日本製薬)、2 mM L-グルタミン(BioWhittaker)、100 μg/ml ストレプトマイシン、

100 U/ml ペニシリン及び 50 μM 2-メルカプトエタノールを補充した D-MEM

25 培地(Invitrogen)中で、37°Cで、5% CO₂のもとで維持した (Takei, Y. et al., (1998)

J. Biol. Chem. 273, 22177-22180, Sakaguchi, N. et al., (1988) EMBO J. 7,

3457-3464, Kimura, H. et al., (1995) Nucl. Acids Res. 23, 2097-2104)。BAL17 は

RPMM-1640 培地(Invitrogen)中で培養した。

2.2. リン酸化 GANP および MCM3 の細胞内局在化

NIH·3T3 を PBS (pH 7.4) 中で 3.7% パラホルムアルデヒドで 5 分間固定し、0.2% Triton X-100 を用いて透過性とした (Kimura, H. et al., (1994) EMBO J. 13, 4311-4320)。ラット抗 pSer⁵⁰² GANP モノクローナル抗体 (Kuwahara, K. et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10279-10283) 及びウサギ抗 MCM3 抗体 Kimura, H. et al., (1994) EMBO J. 13, 4311-4320 を一次抗体として使用した。次に二次抗体として、GANP に対しては Alexa488 結合ヤギ抗ラット IgG 抗体(Molecular Probes)を使用し、MCM3 に対しては Alexa546 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(Molecular Probes)を使用して、ヨウ化 TOTO-3 (Molecular Probes)で対比染色し、そして共焦点レーザー顕微鏡(FV500; オリンパス)によって観察した。

2.3. 発現のための cDNA 構築物

pSR α-MCM3-HA は文献に記載されている (Kimura, H. et al., (1995) Nucl. Acids Res. 23, 2097-2104)。SV40 T-Ag の 3 つの核局在化シグナル(NLS)を担持する pECFP-Nuc ベクターは Clontech より購入した。下記の組み合わせの 3'及び 5' プライマーを用いて得た PCR 断片を pGEX-4T-1 (Amersham)に導入し、それらを用いて異なる形のマウス *ganp* cDNA をグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)との融合タンパク質として調製した。

GANP1-5' : 5'-GGGGATCCATAACCGGG TGAACCCCTT-3' (配列番号 1 1)

GANP1-3' : 5'-GGGTCGACGCGCACAGACTTTCCCCTGA-3' (配列番号 1 2)

GANP2-5' : 5'-GGGAATTCTCCGCCTTCCAGCTGTGAC-3' (配列番号 1 3)

GANP2-3' : 5'-GGGTCGACGTGCTGCTGTATGTCCT-3' (配列番号 1 4)

GANP3-5' : 5'-GGGAATTCCATGAGCT GAGACCCCTCAGC-3' (配列番号 1 5)

GANP3-3' : 5'-GGGTCGACTGAGGATGCAGGAGGCGGCT -3' (配列番号 1 6)

GANP4-5' : 5'-GGGAATTCTACGTTGGAGAGAGCCTGGC-3' (配列番号 1 7)

GANP4-3' : 5'-GGGTCGACCATGCTGTCACTCCTGTGA-3' (配列番号 1 8)

GANP5·5' : 5'-GGGAATTGAGAA CCTGCCAAGGGTCT-3' (配列番号 19)
 GANP5·3' : 5'-GGGTCGACGAAAAACCGACGGCTGA ACT-3' (配列番号 20)
 GANP6·5' : 5'-GGGAATTCAAGCCCTTCCAGCCTGCCCT-3' (配列番号 21)
 GANP6·3' : 5'-GGGTCGACCGAGGGAACGTGGTATTTTC-3' (配列番号 22)

5 GANP7·5' : 5'-GGCCCAGGCC CGTGGGATGACATCATCA-3' (配列番号 23)
 GANP7·3' : 5'-GGCTCGAGCATGTCCACCATCTC CAGCA-3' (配列番号 24)

cDNA 構築物は、PCR 断片を pSVEGFP pA に導入することにより緑色蛍光タンパク質(GFP)をタグした Ganp 変異体として調製した (Kuwata, N. et al., (1999) J. Immunol. 163, 6355-6359)。次に、これらの構築物を pCXN2 哺乳動物
 10 発現ベクター中に導入した (Niwa, H. et al., (1991) Gene 108, 193-200)。プライマー配列は、Ganp をコードするように下記の通り設計した。

Gp-gfp·5' :

5'-GGGGATCCGAATTCCACCATGGCAGTCTCAAACCGATA CC-3' (配列番号 25)

15 *Gp-gfp*·3' :

5'-GCAGGGGCTCCTCCTGATCT-3' (配列番号 26)

Gsac-gfp·5' :

5'-GGGGATC CGAATTCCACCATGTCCGAGGGCCTGGTTCTTG-3' (配列番号 27)

20 *Gsac-gfp*·3' :

5'-CTGTCTT GTTTCTAAGCCGC-3' (配列番号 28)

Gmap80-gfp·5' :

5'-GGGGATCCGAATTCCACCATGGAGA ACCTGGCCAAGGGTCT-3' (配列番号 29)

25 *Gmap80-gfp*·3' :

5'-GAGGACTTGTAGATGTTTCAC CATGG-3' (配列番号 30)

FLAG をタグした Ganp 変異体については、以下のプライマーを用いて PCR により得た cDNA 断片を pCXN2 に導入した。:

FLAG-Gp-5' :

5'-GGGAATTCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGG
CAGTCTTCAA CCGATACC-3' (配列番号 3 1)

FLAG-Gp-3' :

5 5'-GGGAATTCCCTCCGGGTCTCCCTCAAGTA-3' (配列番号 3 2)

FLAG-Gsac-5' :

5'-GGGAATTCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTCCGAGGGCC
TTGGTTCTTG-3' (配列番号 3 3)

FLAGGsac-3' :

10 5'-GGGAATTCGCTGTCTTGTAAAGCCG-3' (配列番号 3 4)

FLAG-Gmap-5' :

5'-GGGAATTCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGG
AGAACCTGGCCAAGGGTCT-3' (配列番号 3 5)

FLAG-Gmap-3' :

15 5'-GGGAATTCTGAGGACTTG TAGATGTTT-3' (配列番号 3 6)

内部欠失変異体 Gp Δ NLS-GFP および I3 変異体(MCM Δ NLS-HA) は、文献に記述されているように調製した (Imai, Y. et al., (1991) Nucl. Acids Res. 19, 2785-2785)。全ての構築物は、スクレオチド配列の決定により配向が正しいこと、およびタグを付けた融合タンパク質としてコドンの読み枠が正しいことを確認し、20 品質を管理した。変異体 RNA/DNA プライマーゼドメイン(PD) を有する発現ベクターは文献に記載されている(Ser⁵⁰² から Ala [GpS502A] 又は Glu [GpS502E] までの Gp 変異体) (Kuwahara, K. et al., (2001). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10279-10283)。

25 2.4.導入した遺伝子産物の共焦点顕微鏡検査による検出

FuGENE 6 (Roche Diagnostics)を用いて、pCXN2-ganp-gfp および／または pSR α -MCM3-HA によって NIH-3T3 をトランスフェクトした。固定化の 16 時間前にレプトマイシン B (LMB; (Kudo, N. et al., (1999) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 96, 9112-9117))を培養培地に添加した。共トランスフェクションの場合はウサギ抗 HA 抗体 (Santa Cruz)および Alexa546 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いて、そして単独トランスフェクションの場合には Alexa488 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes)を用いて、外因性 MCM3 タンパク質を染色した。
5 核酸は、共トランスフェクション実験についてはヨウ化 TOTO-3 を用いて、単独トランスフェクション実験についてはヨウ化プロピジウム(PI; Sigma)を用いて対比染色した。

2.5.GST プルダウンアッセイ

10 GST 融合タンパク質を文献に記述されているように精製した (Kuwahara, K. et al., (2000) Blood 95, 2321-2328)。グルタチオン-Sepharose ビーズ (Amersham)に固定した種々の GST 融合タンパク質(5 μg)を、TNE バッファー (10 mM Tris-HCl [pH 7.8]、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Nonidet P-40、
15 10 μg アプロチニン、1 mM フェニルメチル-スルフォニルフルオリド[PMSF])を用いて調製した BAL17 溶解物と共にインキュベートした。結合タンパク質を 8% SDS-PAGE によって分離し、ニトロセルロースフィルターに転写し、プロックした。次にウサギ抗マウス MCM3 抗体(Kimura, H. et al., (1994) EMBO J. 13, 4311-4320) 及びペルオキシダーゼ標識プロテイン A (Amersham)と共に連続的にインキュベートし、最後に ECL 検出キット(Amersham)を用いてシグナルを可
20 視化した。直接結合アッセイのためには、[³⁵S-メチオニン] (Amersham)を用いて、in vitro 転写および翻訳結合システム(Novagen)を製造者の説明書に従って使用して放射性標識化 MCM3 を合成し、[³⁵S]-標識 MCM3 をオートラジオグラフ
イーで検出した。

25 2.6.導入した遺伝子産物の免疫沈降およびウエスタンプロッティング

FuGENE 6 を用いて、pCXB2-FLAG-ganp および／または pSR α-MCM3-HA によって COS7 をトランスフェクトした。26 時間後、TNE バッファーを用いて細胞を溶解し、得られた溶解物をプロテイン A-Sepharose (Amersham)と組み合

わせた抗 HA 抗体と共にインキュベートした。免疫沈降物を 8% SDS-PAGE によって分離し、ニトロセルロースフィルターに転写し、プロットをブロックし、マウス抗 FLAG M2 抗体(Stratagene)と共にインキュベートし、次にペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG (H+L)抗体(Zymed) と共にインキュベートした。

5 Gp-GFP およびその変異体の検出のためには、プロッティングしたフィルターをウサギ抗 GFP 抗体(Santa Cruz)およびペルオキシダーゼ結合プロテイン A(Zymed)により釣り上げた。

2.7. ヘテロカリオンアッセイ

10 FuGENE 6 を用いて、pSR α -MCM3-HA によって HeLa 細胞をトランスフェクトした。20 時間後、トランスフェクトした HeLa 細胞およびトランスフェクトしていないマウス Swiss-3T3 細胞をトリプシン処理し、1 : 1 の比で共に培養皿に播いた。24 時間後、ポリエチレングリコール 1500 (Roche diagnostics)を室温で 2 分間用いて細胞を融合させた (Schmidt-Zachmann, M.S. et al., (1993) Cell 74, 493-504)。培養皿を培地で 4 回洗浄した後、シクロヘキシミド含有培地を添加し (最終濃度 20 μ g/ml)、細胞を CO₂ インキュベーター中で 37°C で 5 時間インキュベートした。次に、250 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 中で 4% パラホルムアルデヒドを用いて細胞を 20 分間固定し、PBS 中で 0.5% Triton X-100 を 30 分間用いて透過性とし、PBS で洗浄した。抗 HA 抗体(12CA5; Covance Research Products)および Cy3 結合ロバ抗マウス Ig 抗体(Jackson)を用いて細胞を染色した。また、PBS 中で 100 ng/ml Hoechst 33342 (Sigma)を用いて DNA を 20 分間対比染色した。100x PlanNeofluar 位相差対物レンズ (NA 1.3) および SpotII CCD を備えた Zeiss Axioplan を用いて画像を集めた。

25 3. 結果および考察

3.1. GANP と MCM3 の会合

これまでに、B 細胞系統における GANP と MCM3 の相互作用が、共免疫沈降によって実証されている (Kuwahara, K. et al., (2000) Blood 95, 2321-2328)。

GANPのC末端領域は全Map80タンパク質と同一であるため、GANPは同一領域でMCM3と会合すると予想される。本発明者は、どの領域がMCM3と直接会合するのかを決定するため、図32に示す種々の末端切断型GANPを有するGST融合タンパク質を用いてプルダウンアッセイを実施した。GSTを図32に示される1から7及び5-7'を称した切断型GANPのN末端に融合した。図33の下のパネルにおいて、GANP5-7'を称するMap80領域は、以前に示されたように (Kimura, H. et al., (1994) EMBO J. 13, 4311-4320)、細胞抽出物からMCM3をプルダウンした。

驚くべきことに、GANPの部分断片であるGANP1およびGANP2もまたMCM3をプルダウンした (図33；上および下パネル)。

10 次に、網状赤血球溶解物系により、*in vitro*で合成したMCM3を用いてこの結合を調べた (図34)。GST-GANP1 およびGST-GANP2 もまた*in vitro*翻訳カクテルから [³⁵S]-MCM3 をプルダウンした。

15 GST単独を用いた陰性対照 (最初のレーン)、又は、無関係なタンパク質と融合したGSTは、シグナルを示さなかった。そして、GST-GANP1との結合はMap80領域 (GST-GANP5-7')との結合よりも強かった。この結合は、FLAGをタグした構築物を用いたDNAトランスフェクション実験により細胞においても確認された (図35)。

20 COS7 細胞を pSR α-MCM3-HA 又は pSRα-I3-HA と組み合わせて、pCXN2-FLAG-Ganp、pCXN2-FLAG-Gp及びpCXN2-FLAG-Gmap80によって共トランスフェクトした。抗HA抗体を用いた免疫沈降の後、抗FLAGモノクローナル抗体でウエスタンプロットを行った。FLAG標識タンパク質の予想サイズを、それぞれのレーンにおいて三角で示す。左及び右のパネルは、バンドの移動度 (migration) が同様であるが、ECL検出の露光時間は左のパネルが 1 分、及び右のパネルは 3 分である (図35)。

25 FLAG-Ganp、FLAG-Gp およびFLAG-Gmap80は野生型MCM3-HA (HAエピトープをタグしたMCM3)と結合した (図35; 左パネル)。FLAG-Gsac のみが結合しなかった。I3 変異体 MCM3 (MCM3 △ NLS)との結合に関しては、FLAG-Gmap80のみが陽性の結果を示した (図35; 右パネル)。N末端NLSを担持

するGp領域は、大量のMCM3を有する細胞において一貫してMCM3と会合している（図35；左パネル）。これらの結果は、GANPがGp領域を介してMCM3のNLS領域と会合していることを示している。

5 本発明者はさらに、Gp領域のSer⁵⁰²のリン酸化の状態がMCM3との結合に影響するかどうかを検討した。プライマーゼ部位を欠損したGanp変異体(Ganp Δ PD-GFP)、及びGanpS502A又はGanpS502Eとして調製されるSer⁵⁰²におけるGanp変異体を、GFPと融合した（図36A）。細胞をpCXN2-Ganp-gfpとpSR α -MCM3-HAによって共トランスフェクトし、溶解液は抗HA抗体を用いた免疫沈降に用いた。

GFPシグナルは抗GFP抗体で検出され（図36B；上パネル）、このことは、GANPがMCMに結合したことを意味する。

15 Ganp-GFP変異体との共トランスフェクションも同様に行った。それぞれのタンパク質の予想位置を決定するために、溶解液をSDS-PAGE上で分離し、同じよう抗GFP抗体でプロットした（図36B；下パネル）。

非リン酸化性の変異体(GanpS502A-GFP)は、野生型Ganp-GFPまたはホスホセリンに良く似た変異体(GanpS502E-GFP)と同じくMCM3と結合した（図36B；上パネル）。興味深いことに、Ganp Δ PD-GFPはMCM3-HAと共に沈降しない（図36B；上パネル）。

20 GANP分子全体としては、Map80領域の潜在的結合活性に関わりなく、MCM3との結合にはRNAプライマーゼ領域(PD)が必要である。白抜き三角はGanp Δ PD-GFPの位置を示す。Ganp S502A-GFPおよびGanp S502E-GFPのサイズと等しいGanp-GFPのサイズを黒三角で示す（図36B；下パネル）。これらの結果は、GANPのMCM3との結合はそのPD領域を介するが、Ser⁵⁰²部位におけるリン酸化はこの結合に影響しないことを示している。

末端切断型構築物を用いた実験によってGANPとMCM3との会合が広い領域にわたって示されたが、GANPのN末端の600個のアミノ酸領域が関与する全GANPとの結合にはMCM3のNLSが必要とされる。NLSを欠くMCM3変異体

は、細胞中で全 GANP 分子と効果的に会合できなかった。Map80 領域は NLS 陰性 MCM3 と結合し、このことは GANP の MCM3 との結合が主として Map80 との相互作用に必要とされる領域以外との結合であることを示している。Map80 は MCM3 インポート因子であると考えられているが、GANP は MCM3 と共同して異なる役割を果たすのかもしれない。GANP は可能性のあるリン酸化部位を多数有し、そして細胞中に多くの会合成分をもつように思われる (Kuwahara, K. et al., (2000) *Blood* 95, 2321-2328)。したがって、その領域のリン酸化の状態が GANP/MCM3 会合および細胞質と核コンパートメント間の輸送の調節に影響を及ぼす領域を特定することが必要であろう。

10

3.2. トランスフェクションによって示される Map80 および Ganp 変異体の細胞内局在化

GANPは2つの可能性のあるNLSを有する。1つはN末端プライマーゼ領域内にあり、もう1つはC末端Map80領域内にある。また、GANPは2つの核輸出シグナル(NES)様モチーフを有する。1つはSAC3相同領域とMap80領域との間にあり、もう1つはMap80領域内にある。

NIH-3T3細胞をpCXN2-Ganp-gfp又はpCXN2-Gmap80-gfpによってトランスフェクトし、48時間後に固定した。LMBを、固定の16時間前に添加した。核をPIで前染色し、共焦点顕微鏡を用いて画像を集積した。代表的な発現特性を図37に示す。異なる特性を持つ細胞数を計数し、パーセントとして表した（図37）。

Ganp-GFP（GFPでタグしたほぼ全長GANP）は、核優性発現(NおよびN>C; 38%)又は細胞質優性発現(CおよびC>N; 31%)を示す細胞の割合に変動はあったが（合計500個の細胞から任意に計算された数の%）、細胞質および核コンパートメントの両方に存在することが見いだされた（図37; Ganp-GFP, LMB -）。対照的に、Gmap80-GFP は殆ど細胞質に見出され、発明者の分類による核優性発現は示さなかった (N>C, 0%; N=C, 35%; C and C>N, 65%)(図37; Gmap80-GFP, LMB -)。Ganp-GFPの局在化は、Gmap80-GFPの局在化とは異なる。

N 末端 NLS モチーフが機能性であるかどうかを確かめるため、RNA/DNA プ

ライマーゼドメインおよびN末端NLSを担持する(ただしNES様モチーフは含まない)5'1-kbDNA断片をGFPと融合させた(図38, Gp-GFP)。このGp-GFP産物は核にのみ存在したが(NおよびN>C, 94%)(図38)、NLSを欠く変異体Gp-GFP(Gp Δ NLS-GFP;図38に示すようにアミノ酸497から500が欠失している)は細胞質性であることを示し、N末端NLSが核局在化に関与していることが確認された。

本発明者は、隣接するSer⁵⁰²のアラニンへの突然変異(GpS502A-GFP;非リン酸化型)又はグルタミン酸への突然変異(GpS502E-GFP;ホスホセリンを模倣する型)がこの局在化に影響を及ぼすかどうかを検討した(図38)。そして、本発明者は、これらの突然変異がGpの局在化を変えないことを観察した。これは、N末端NLSがSer⁵⁰²のリン酸化状態に関わりなく機能性であることを示唆している(図38)。対照的に、N末端NLSもC末端NLSも持たないGac-GFPは、殆どが細胞質中に存在するように思われる(N及びN>C, 0%; N=C, 3%; C及びC>N, 97%)(図38)。

これらの結果は、N末端NLSがGanpの核への移入に機能的な役割を有することを示唆している。しかし、NLSはGANP発現を核内に維持するほど強くはないのかもしれない。なぜなら、Ganp-GFPは細胞質中にも存在するからである(図37)。この問題をさらに検討するため、Crm1によって媒介される核への輸出を抑制するため、cDNAトランスフェクション後、細胞をレプトマイシンB(LMB)で処理した(Kudo, N. et al., (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9112-9117)。

LMBで処理した細胞では、殆どのトランスフェクタントにおいてGanp-GFPは核に局在化した(図37)。優性な細胞質発現を示す細胞画分は31%から4%に減少し、対照的に、核において優性な発現を示す細胞が38%から81%に増大した。従って、Ganpの細胞質への移行はLMBによって抑制されるようと思われる。

Gmap80-GFPの局在化もまたLMB処理後、劇的に変化した(図37)。すなわち、細胞質発現を示す細胞画分が65%から37%に減少し、優性な核発現を示す細胞画分が0%から41%に増大した。これらの所見は、COS7およびLtk-細胞を含む

他の細胞系においても再現され、核から細胞質への GANP 輸出が Crm1 依存性経路によって調節されていることを示している。従って、GANP 及び Map80 は核と細胞質の間をシャトリング（往復）しているように思われ、そしてそれらの局在化は他の分子と共同している核移入および輸出機構の間のバランスに依存するようである。

3.3. 共トランسفェクトした細胞における MCM3 および GANP の局在化

次に、本発明者は GANP の移行が MCM3 発現と関連しているかどうかを検討した。哺乳動物の MCM3 は、細胞周期中にクロマチンとの結合状態を変化させるが、10 間期の間を通して核にのみ存在する (Kimura, H. et al., (1994) EMBO J. 13, 4311-4320)。 NIH-3T3 細胞を、 pSR α -MCM3-HA 又は pSR α -I3-HA によってトランسفェクトし、固定し、抗 HA 抗体 (Alexa488) で免疫標識し、 PI で染色した。

トランسفェクトした MCM3-HA は、典型的な NLS の存在と合致して (Kimura, H. et al., (1994) EMBO J. 13, 4311-4320, Takei, Y. et al., (1998) J. Biol. Chem. 15 273, 22177-22180)、核に局在化した (図 39)。この核局在化は MCM3 の NLS に依存した。なぜなら、この NLS を欠く変異体 MCM3 (I3; MCM3 Δ NLS-HA) は、細胞質にのみ発現されたからである (図 39; 右パネル)。

細胞を、 pCXN2-Ganp-gfp 又は pCXN2-Gmap80-gfp 及び pSR α -MCM3-HA によって共トランسفェクトし、固定し、抗 HA 抗体 (Alexa546) で免疫標識し、核を 20 TOTO-3 で前染色した (図 40)。細胞数はパネルの下に示す (図 40)。

興味深いことに、 Ganp-GFP を用いて共トランسفェクションした場合、細胞の 17% において MCM3 の細胞質局在化がもたらされた (図 40, 白い矢印で示す)。 Gmap80-GFP または Gp-GFP を用いた共トランسفェクションの場合には、そのような結果はみられなかった。

25 MCM3 への Ganp の効果が特異的であることを証明するために、核において出現する ECFP-Nuc の発現を、異なる ganp-gfp 構築物のトランسفェクション前後で調べた。Ganp-GFP でトランسفェクトした代表画像を示す (図 41)。ECFP-Nuc の核への局在化は、 Ganp-GFP (図 41) 又は Gmap80-GFP 又は Gp-GFP を用いた共

トランスフェクションのいずれによっても影響されなかった。

Ganp及びMCM3の共発現もまたGANP局在化の変更をもたらした。Ganp-GFP単独(38%)及びGmap80-GFP単独(0%)のトランスフェクション(図37)と比較して、MCM3を用いた共トランスフェクションはGanp-GFP(74%)および5 Gmap80-GFP(64%)の核発現レベルを増大させた(図40)。MCM3は、GANPおよびMap80を核内に保持したが、Ganpの過剰発現のみがMCM3の細胞質における出現を促進した(図40; Ganp-GFP発現によって17%)。他方、Gmap80 MCM3の細胞質における出現を促進しなかった(Gmap80-GFP発現によって4%)。MCM3のNLSにおける突然変異(I3; MCM3 Δ NLS-HA)(その結果、MCM3は細胞質に10 存在することになる)は、Ganp-GFPまたはGmap80-GFPの核への蓄積を引き起こさなかった(図42)。

野生型MCM3とは異なり、I3変異体(MCM3 Δ NLS-HA)はGanp又はGpと会合しない(図35)という事実を考え合わせるならば、MCM3のNLSモチーフは、細胞においてGANPとの機能的会合および核と細胞質間のGANPの輸送に必要であることが示唆される。
15

DNAトランスフェクション実験は、MCM3と共に導入された場合、Ganp-GFPが核コンパートメントに蓄積することを示し、核におけるGANP/MCM3複合体の形成を示唆した。MCM3はCrm1によって認識される明らかな共通NES様モチーフを含まず、したがって核からのMCM3の輸出は、恐らく、NES様モチーフを20 有する他の結合分子または異なる輸出機構に依存するのであろう。GANP上の2つのNES様モチーフは、LMB感受性Crm1依存性輸出経路に関与しているように思われる(図37)。GANPによって担持される2つのNES様モチーフ(これらはCrm1によって認識されるのかもしれない)は、複合体の輸送に関与している可能性がある。

25 最近、GANP相同領域を担持する酵母SAC3が、あるタンパク質の核輸出に関与し、そして核膜孔複合体の成分と会合することが示された(Jones, A.L. et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 3224-3229)。GANPとの共発現は、MCM3の細胞質コンパートメントへの局在化を変化させた。

細胞融合技法を用いて、MCM3の核・細胞質間シャトリング(往復)を調べた (Schmidt-Zachmann, M.S. et al., (1993) Cell 74, 493-504)。HeLa細胞を最初 MCM3-HAでトランスフェクトし、次にトランスフェクトしていないマウス Swiss-3T3細胞と融合させた。タンパク質合成を抑制するためシクロヘキシド 5 の存在下で5時間インキュベートした後、細胞を固定し、MCM3-HA を免疫標識した。ヘキスト(Hoechst)染色によってヘテロカリオンを調べた。この染色は、「まだらの」ヘテロクロマチンを有するマウスの核（矢印）をヒトHeLa核と区別する。

図43に代表的なものを示すように、MCM3-HA はヘテロカリオン中にヒトおよびマウスの核の両方に見出された。融合されていないマウスの細胞は、そのような染色を示さない。このことは、MCM3-HAがHeLa核から細胞質へ輸出され、次にマウス核に移入されたことを示している。

これらの結果から、MCM3-HAはシャトリングタンパク質であると結論される。なお、トランスジーン産物と同じような感度で内因性タンパク質の核から細胞質 15 への移行を実証することはしばしば困難である (Kimura, H., Ohtomo, T. et al., (1996) Genes Cells 1, 977-993、 Mizuno, T. et al., (1999) Mol. Cell. Biol. 19, 7886-7896)。本実施例に示す結果についても、そうであった。酵母のようなより原始的な細胞で達成されたとの同じような感度で、哺乳動物細胞における内因性 MCMタンパク質の核から細胞質への移行を実証することもまた困難である。

20 しかしながら、本発明者の結果は、(実験はDNAトランスフェクション法によつて行ったが) 未操作細胞においてMCMタンパク質の核・細胞質間シャトリングが恐らく重要であることを示している。細胞周期の進行中におけるMCM複合体の核・細胞質間移動の明確な理解を容易にするには、さらなる成分の発見が必要であるかもしれない。

25

3.4.細胞周期の間のGANPの局在化

RNA/DNA プライマーゼドメインのGANPに特有のエピトープ(pSer⁵⁰² GANP)に特異的なモノクローナル抗体を用いて、共焦点レーザー顕微鏡検査によ

つて NIH-3T3細胞におけるGANPの局在化を調べた (Kuwahara, K. et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10279-10283)。細胞周期の異なる時期にあるNIH-3T3細胞を、抗pSer⁵⁰² GANP (Alexa488; 緑)及び抗MCM3 (Alexa546; 赤)抗体で免疫染色した。核をTOTO-3ヨウ化物 (青) で前染色した。間期の間、
5 上記モノクローナル抗体は核小体を除く核内のすべてで反応した (図44)。

抗MCM3抗体および核酸を染色するTOTO-3を用いた三重標識によって、有糸分裂の間のGANPの局在化を詳しく分析した。細胞が前中期から中期へ進むにつれ、GANPは濃縮クロマチンから解離されてくるように思われる (図44)。重ね合わせた画像の黄色いシグナルはGANPとMCM3との共局在化を示すが、若干の
10 青い染色は前中期画像の中心部でGANPが単独でも見えることを表している。この段階では、GANP及びMCM3は濃縮された染色体と重なり合っていない。中期の細胞においては、GANPは紡錘体領域に検出される。そしてこのシグナルは後期に染色体が2つの娘細胞に分離する間に減少する。

減数分裂後期においては、GANPの殆どは核が形成されるまで (終期)、細胞質
15 コンパートメントに見出される。これらの結果は、GANPおよびMCM3の挙動が類似していて、これら2つは間期の間を通じて殆ど核に共局在化することを示している。このことは、これら2つの相互会合と一致している。しかし、有糸分裂の間に共焦点顕微鏡検査によって示されたように、GANPおよびMCM3は別々に存在することもできる (図44)。

20 第2型のRNA/DNAプライマーゼに関する核・細胞質間のGANPシャトリングの生物学的意味は、今後の解明を待たなければならない。それはDNA修復の最終段階におけるRNAプライマーの生成に関連するのかもしれない。正常細胞ではGANPの発現レベルは低いが、細胞が急速に増殖する胚中心においてはアップレギュレーションされる (Kuwahara, K. et al., (2000) Blood 95, 2321-2328、
25 Kuwahara, K. et al., (2001). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10279-10283)。GANPはまた、速い細胞終期を有するある種の細胞においてより高レベルで発現される。このことは、MCM複合体との会合がDNA複製を刺激する可能性を示唆している (Kuwahara, K. et al., (2001). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98,

10279-10283)。RNA/DNA プライマーゼ活性、MCM3 結合能、およびアセチルトランスフェラーゼドメイン (Takei, Y. et al., (2001) EMBO Rep. 2, 119-123 を有する GANP の発現は、細胞周期進行の調節に関与しているのかもしだれない。

5 配列表フリーテキスト

配列番号 5 : プライマー

配列番号 6 : プライマー

配列番号 7 : プライマー

配列番号 8 : プライマー

10 配列番号 9 : プライマー

配列番号 10 : プライマー

配列番号 11 : プライマー

配列番号 12 : プライマー

配列番号 13 : プライマー

15 配列番号 14 : プライマー

配列番号 15 : プライマー

配列番号 16 : プライマー

配列番号 17 : プライマー

配列番号 18 : プライマー

20 配列番号 19 : プライマー

配列番号 20 : プライマー

配列番号 21 : プライマー

配列番号 22 : プライマー

配列番号 23 : プライマー

25 配列番号 24 : プライマー

配列番号 25 : プライマー

配列番号 26 : プライマー

配列番号 27 : プライマー

配列番号 2 8 : プライマー

配列番号 2 9 : プライマー

配列番号 3 0 : プライマー

配列番号 3 1 : プライマー

5 配列番号 3 2 : プライマー

配列番号 3 3 : プライマー

配列番号 3 4 : プライマー

配列番号 3 5 : プライマー

配列番号 3 6 : プライマー

10

産業上の利用の可能性

本発明による GANP を過剰発現したマウスを用いることによって、従来では得られることのできなかったウイルス抗原に特異的で高親和性の抗体を速やかに作製することができる。そのため、エイズや C 型肝炎のように遷延する感染による病状悪化を当該のウイルス抗原の変異に遅れないで特異的で強力な抗体を速やかに得ることが可能となると期待される。また、これによって、感染患者からのウイルスの抗原の変異に対応するオーダーメードの特異的抗体を作製することができる。抗体の作製に必要な免疫期間は 10 日程度で十分であり、そのうち高親和性の変異を持つ抗体の產生効率は 60 % 近くに上る。ベッドサイドの患者サンプルを用いる高親和性抗体の產生プロトコールはワクチン療法に変わる新しい免疫療法となると期待される。

請求の範囲

1. GANP 遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物又はその子孫。
2. 導入した GANP 遺伝子が B 細胞で発現するものである請求項 1 記載のトランジエニック哺乳動物又はその子孫。
5
3. GANP 遺伝子をトランスフェクトした ES 細胞から発生させた、請求項 1 又は 2 に記載のトランスジェニック哺乳動物又はその子孫。
4. 哺乳動物がマウスである請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック哺乳動物又はその子孫。
10
5. 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック哺乳動物又はその子孫の一部。
6. 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック哺乳動物又はその子孫に抗原を投与し、得られる動物又は子孫から抗体を採取することを特徴とする高親和性抗体の製造方法。
15
7. 請求項 6 記載の方法により得られる高親和性抗体又はその断片。
8. 親和性が 1×10^{-7} (M) 以下で示されるものである請求項 7 記載の抗体又はその断片。
10
9. ポリクローナル又はモノクローナル抗体である、請求項 7 又は 8 記載の抗体又はその断片。
20
10. 請求項 9 記載の抗体又はその断片の V 領域を含む、ヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片。
11
11. 請求項 8~10 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその断片、及び請求項 11 記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片からなる群から選択される少なくとも 1 つを含有する医薬組成物。
25
12. 抗原を投与した請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のトランスジェニック哺乳動物又はその子孫から採取される、高親和性抗体産生細胞。

補正書の請求の範囲

[2004年4月5日 (05. 04. 04) 国際事務局受理：出願当初の請求の範囲
1,2,3,4,5,6,11及び12は補正された；他の請求の範囲は変更なし。 (1頁)]

1. (補正後) GANP 遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫。

5 2. (補正後) 導入した GANP 遺伝子が B 細胞で発現するものである請求項 1 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫。

3. (補正後) GANP 遺伝子をトランスフェクトした ES 細胞から発生させた、請求項 1 又は 2 に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫。

4. (補正後) 哺乳動物がマウスである請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のト
10 ランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫。

5. (補正後) 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト
哺乳動物又はその子孫の一部。

6. (補正後) 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト
哺乳動物又はその子孫に抗原を投与し、得られる動物又は子孫から抗体を採取
15 することを特徴とする高親和性抗体の製造方法。

7. 請求項 6 記載の方法により得られる高親和性抗体又はその断片。

8. 親和性が 1×10^{-7} (M) 以下で示されるものである請求項 7 記載の抗体又は
その断片。

9. ポリクローナル又はモノクローナル抗体である、請求項 7 又は 8 記載の抗体
20 又はその断片。

10. 請求項 9 記載の抗体又はその断片の V 領域を含む、ヒト型化抗体若しくは
ヒト抗体又はそれらの断片。

11. (補正後) 請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその断片、及び
請求項 10 記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片からなる
25 群から選択される少なくとも 1 つを含有する医薬組成物。

12. (補正後) 抗原を投与した請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のトランスジェ
ニック非ヒト哺乳動物又はその子孫から採取される、高親和性抗体産生細胞。

条約第 19 条（1）に基づく説明書

請求の範囲第 1, 2, 3, 4, 5, 6 および 12 項は、「トランスジェニック哺乳動物」を「トランスジェニック非ヒト哺乳動物」に補正したものである。

請求の範囲第 11 項は、引用する請求の範囲の項数を記載内容に即して変更し、「請求項 8~10 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその断片」を「請求項 7~9 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその断片」に補正し、及び「請求項 11 記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片」を「請求項 10 記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片」に補正したものである。

図 1

7週 40週

MRL/Ipr

NZB

C57BL/6

図 2

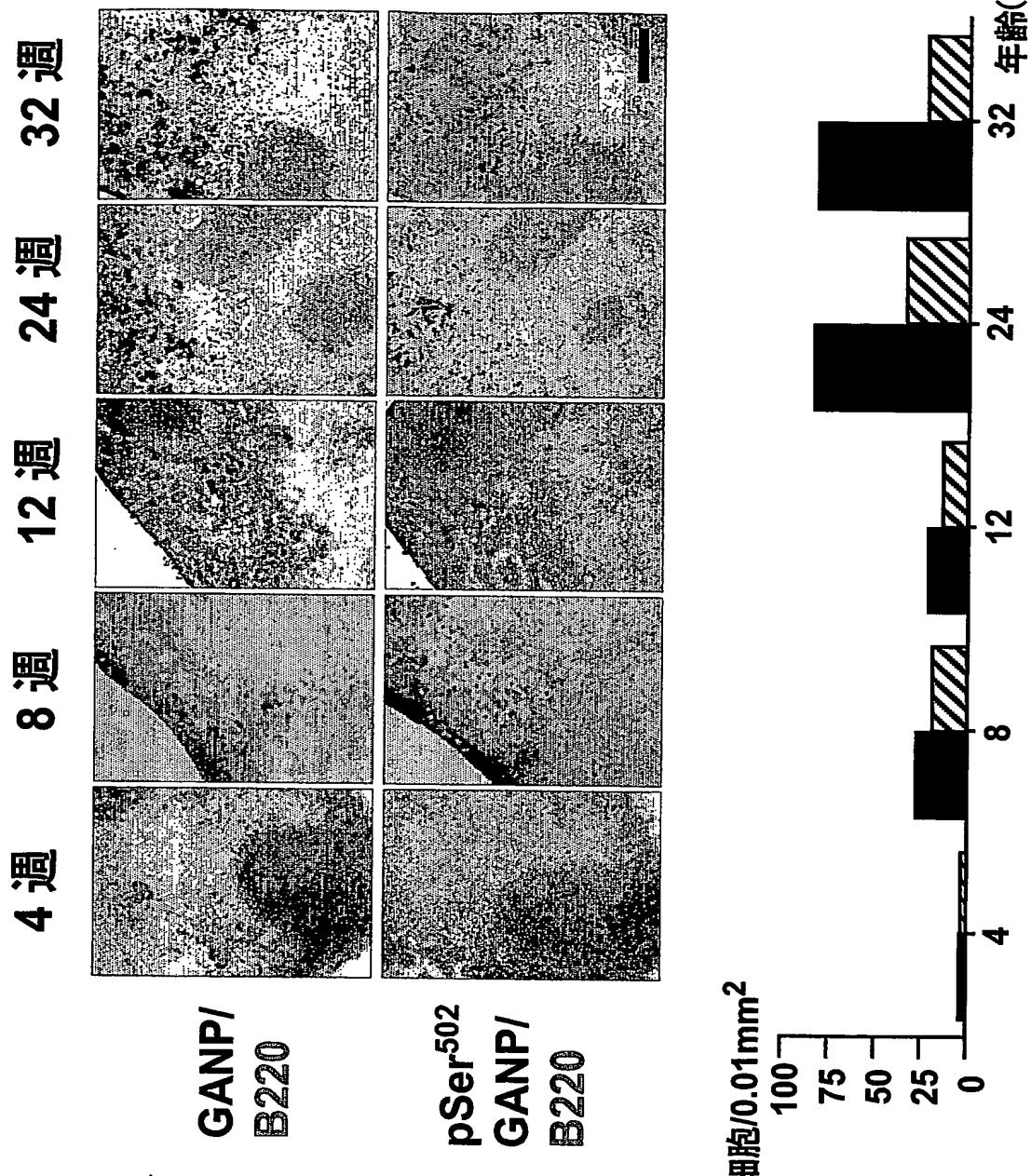


図 3

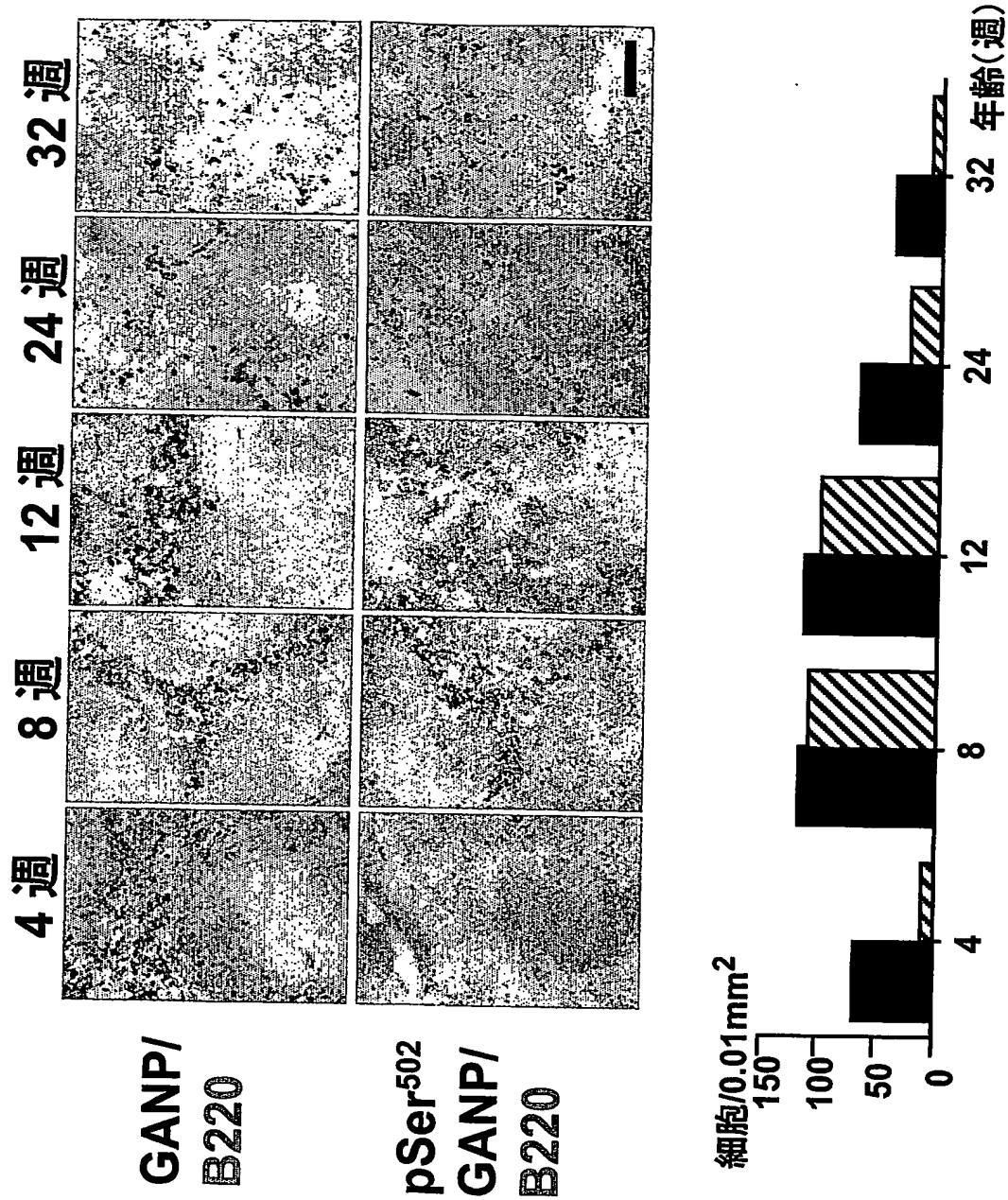


図 4

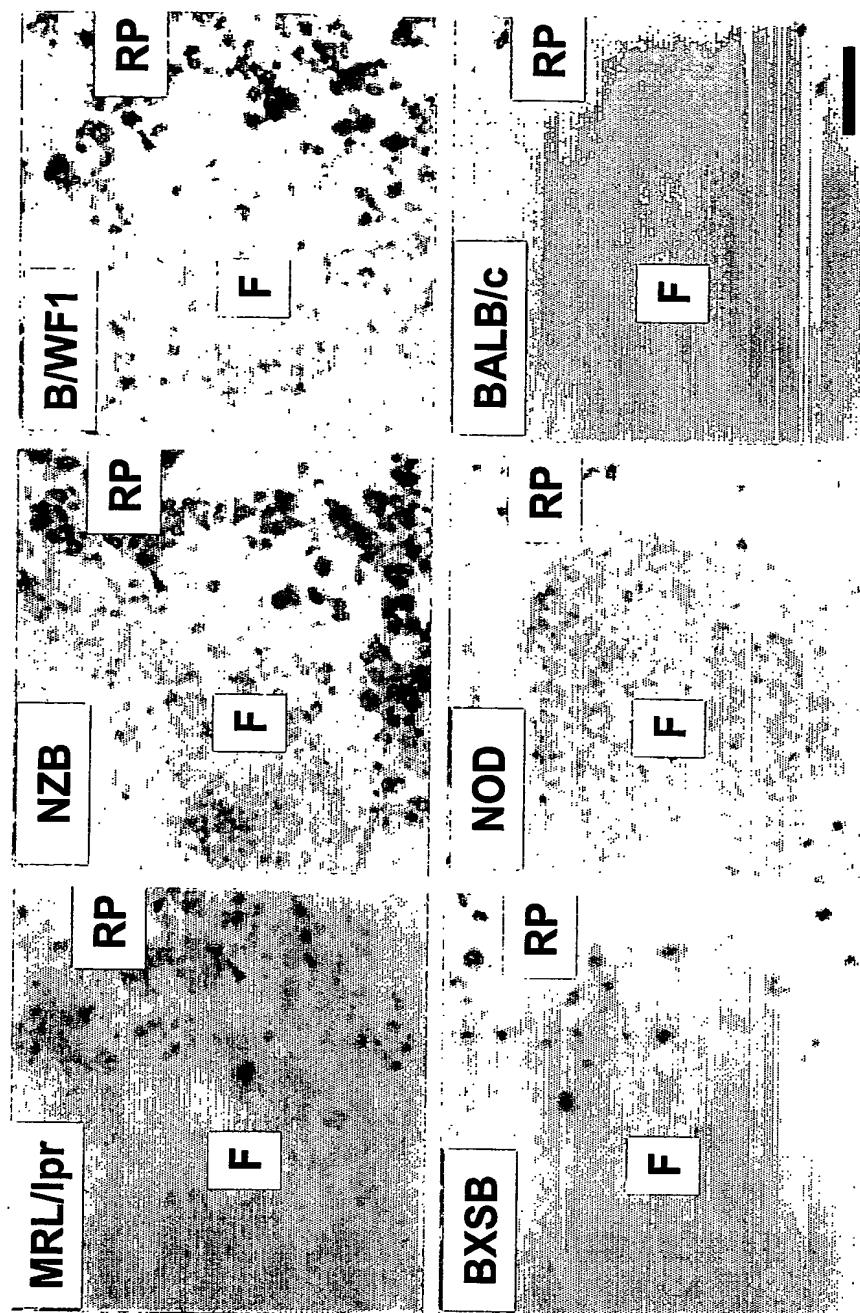


図 5

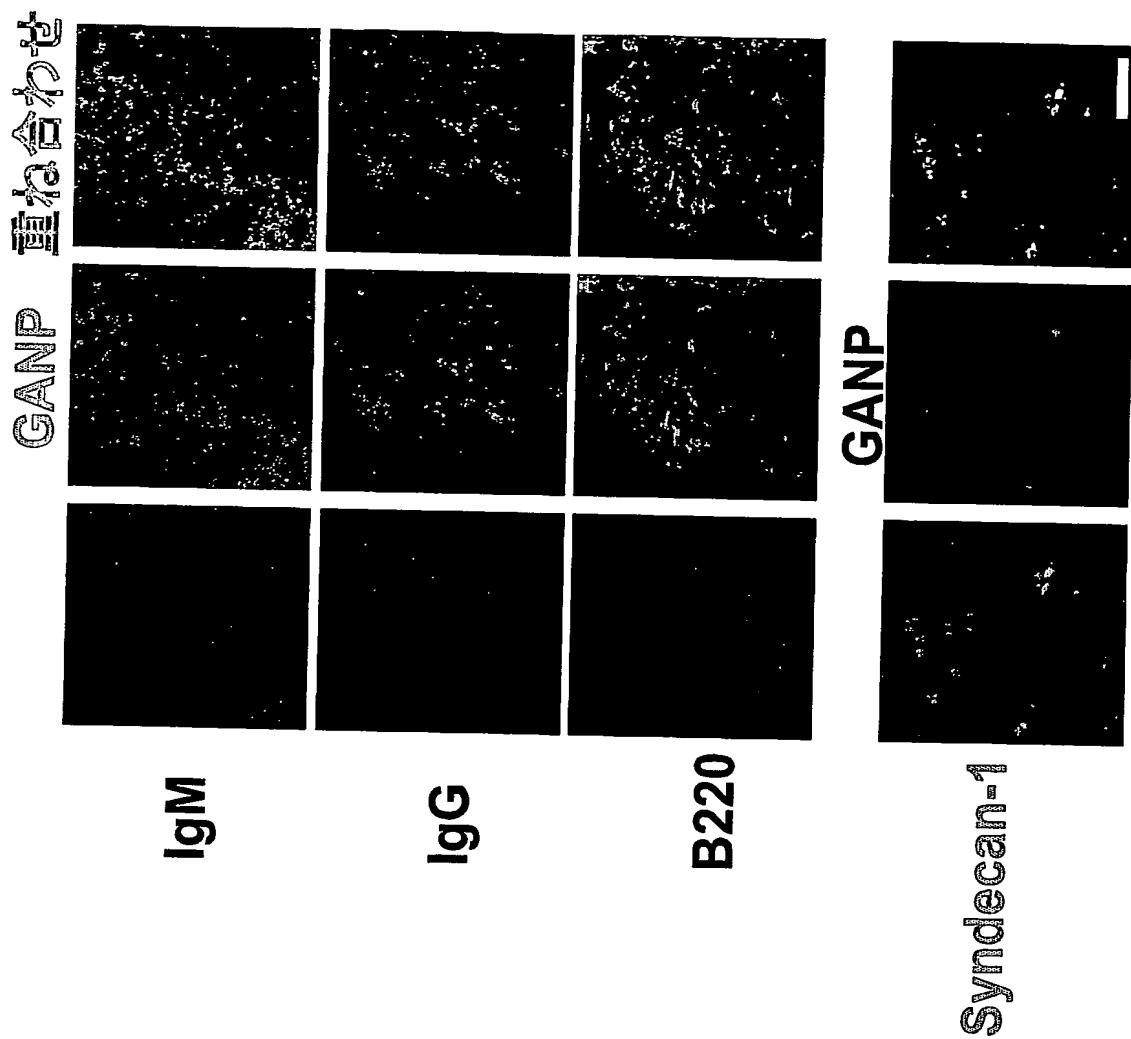


図 6

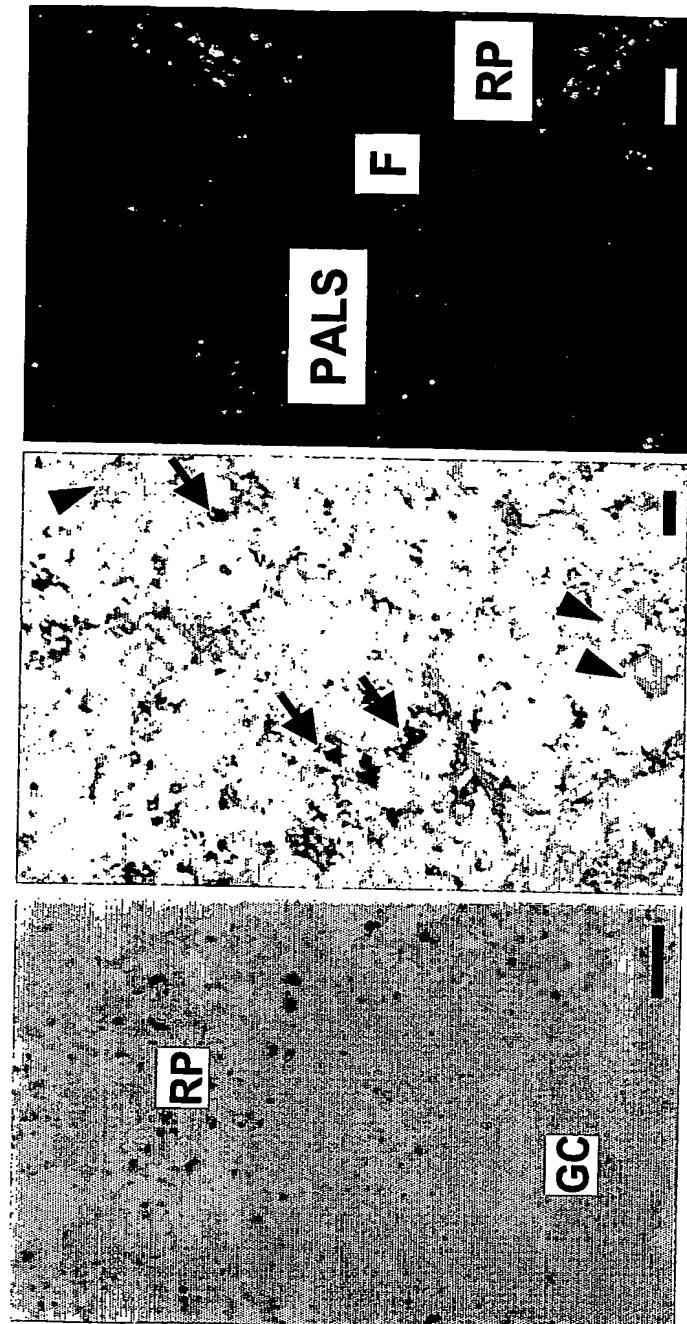


図 7

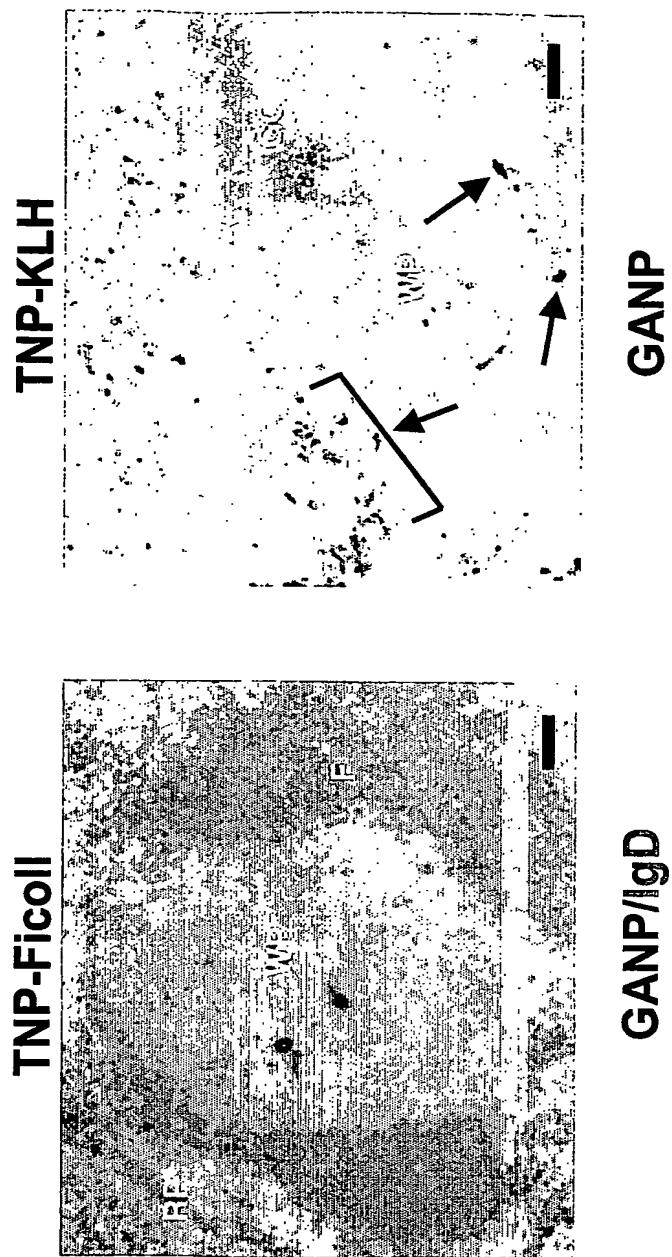


図 8 A

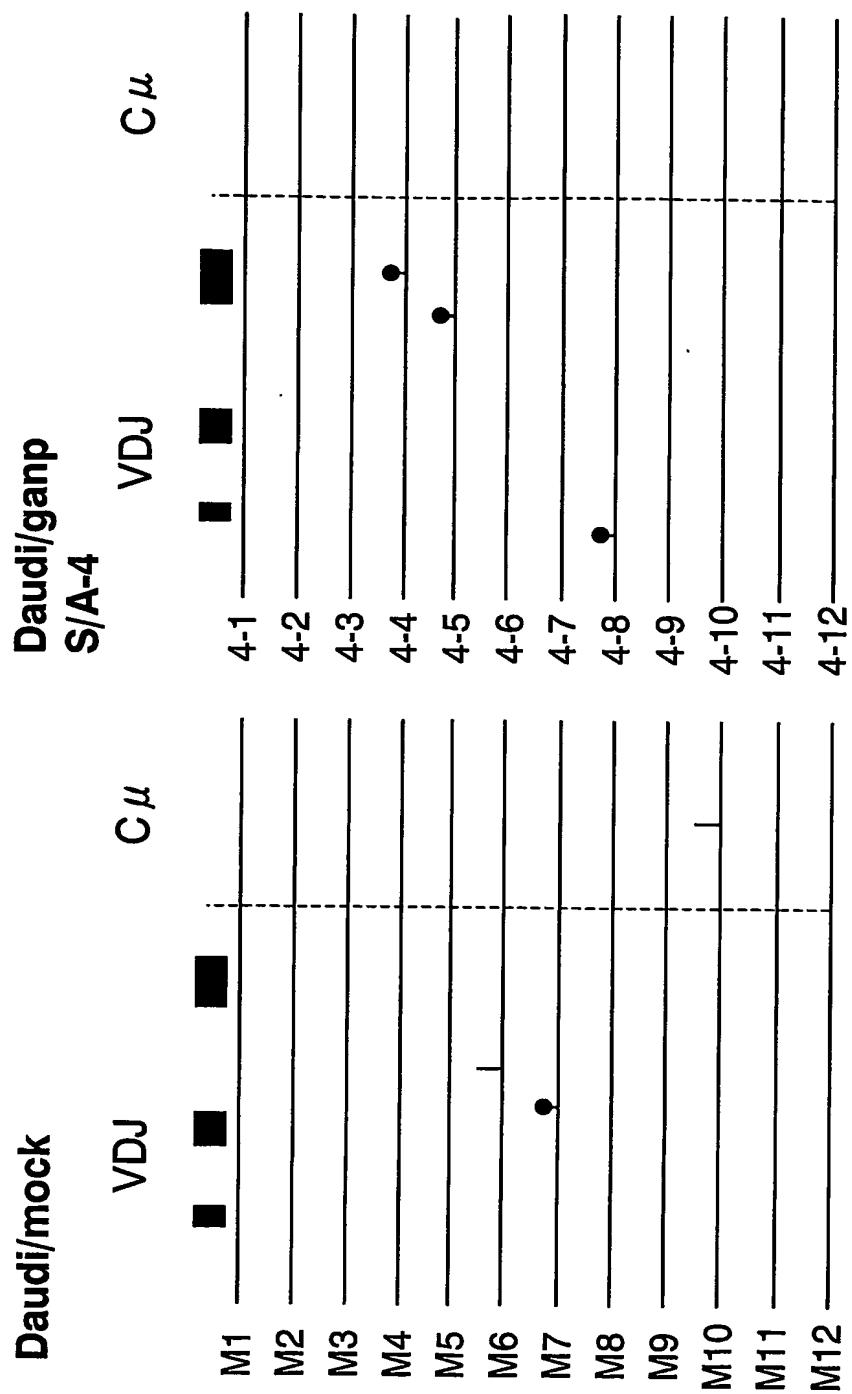


図 8 B

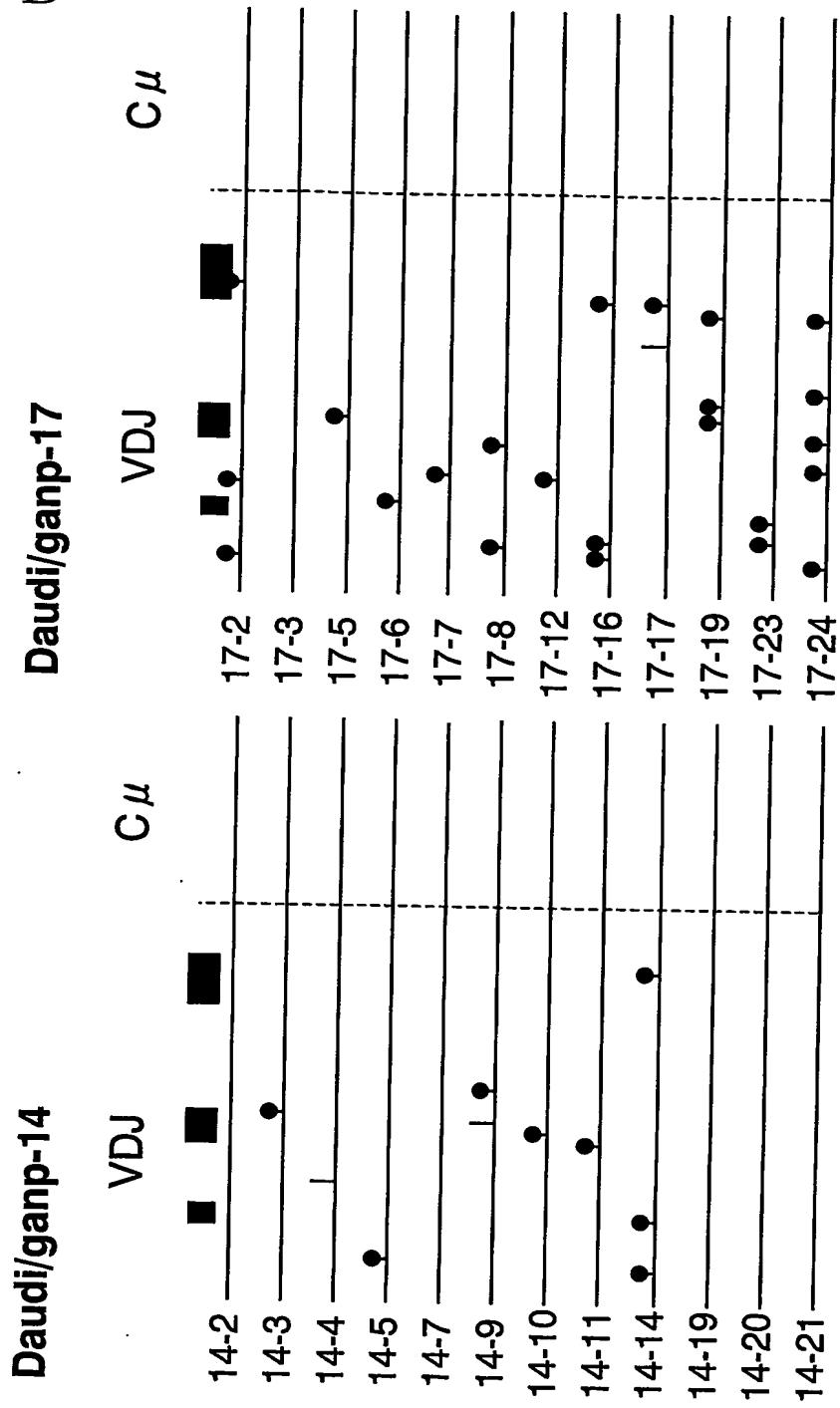


図 8 C

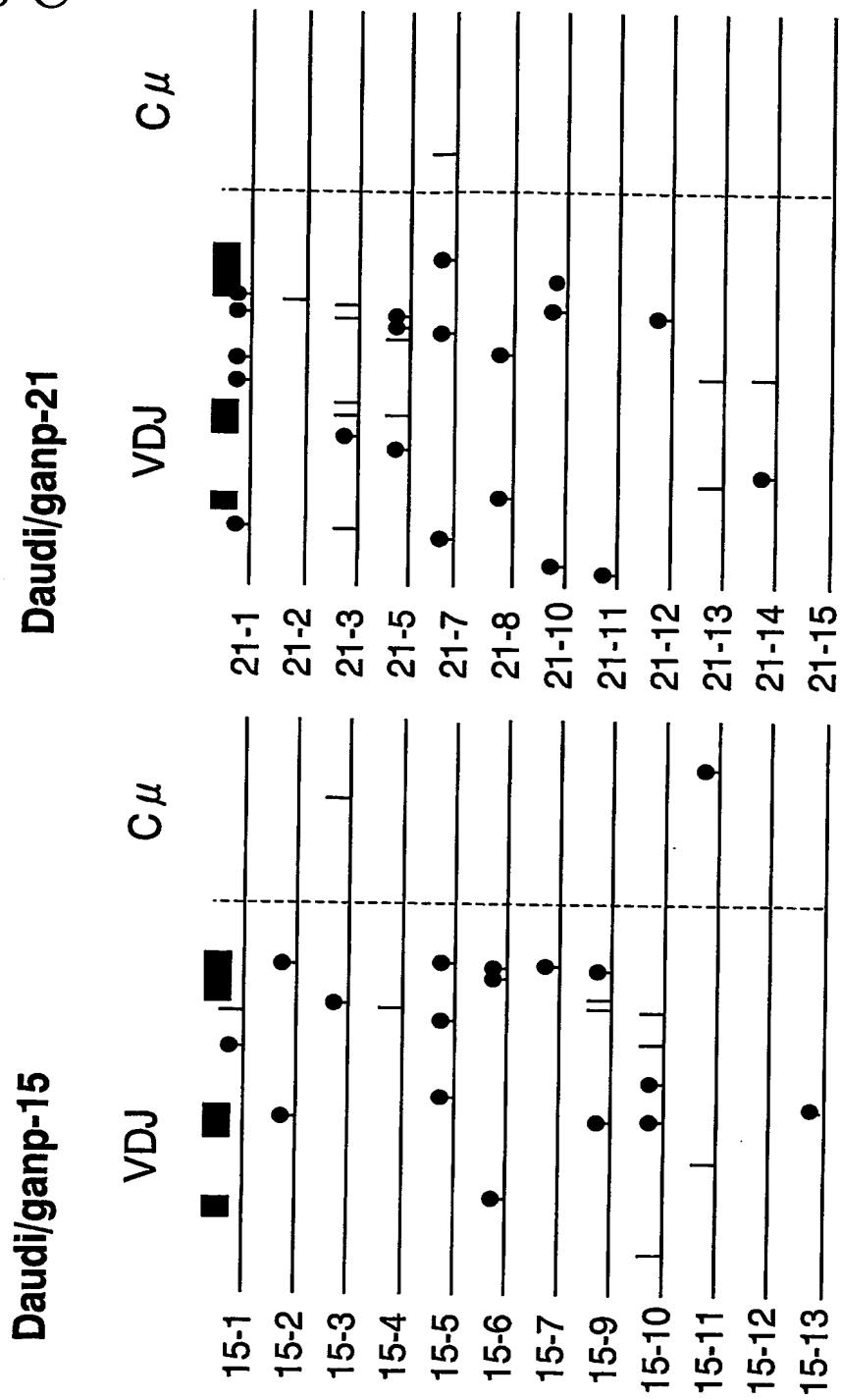


図 9 A

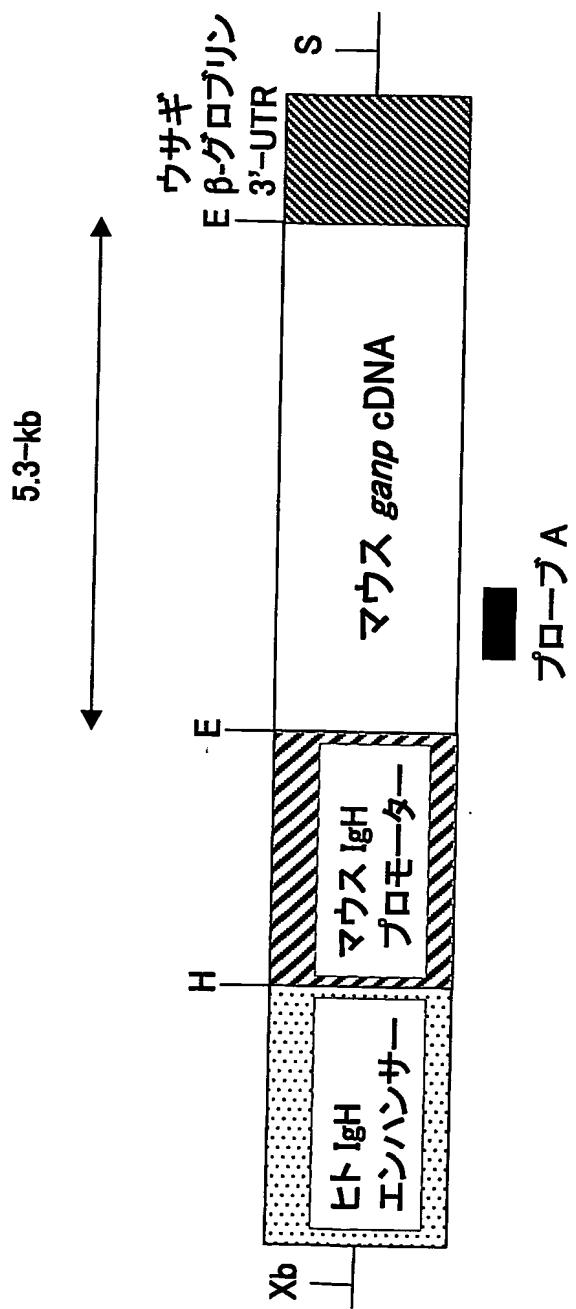


図 9 B

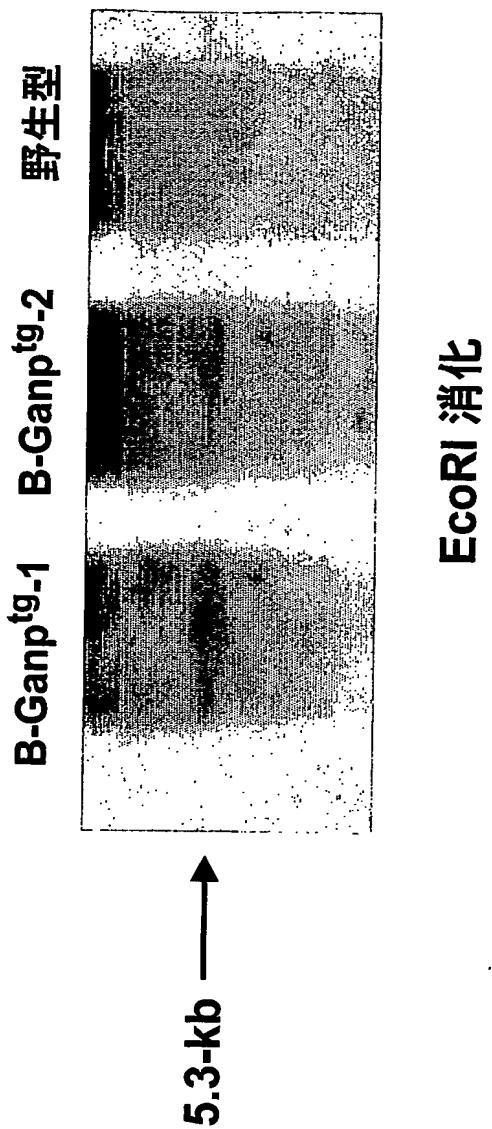
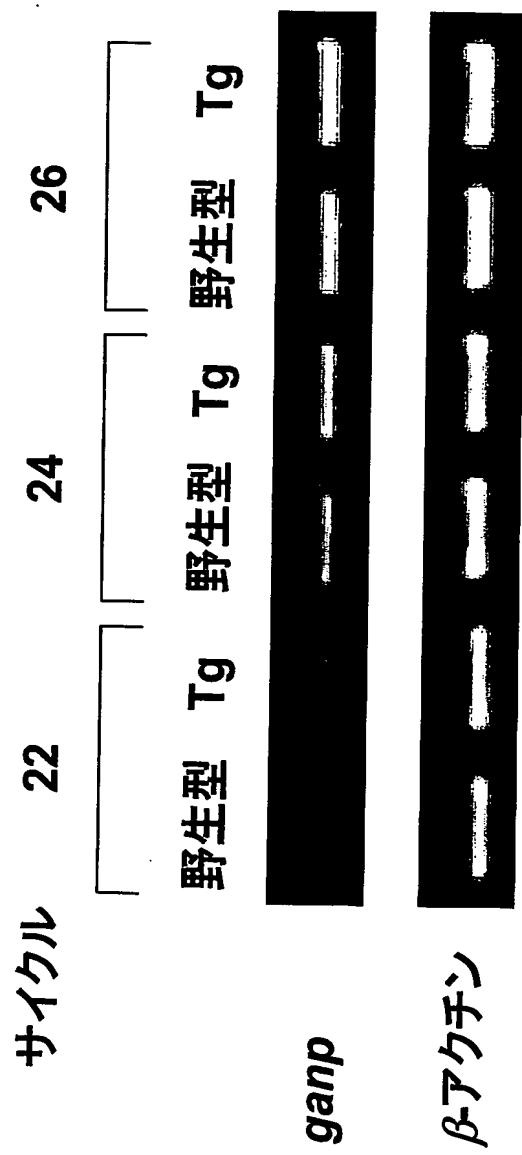


図 9 C



☒ 10

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
 Q V Q L Q P G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F T
 CGG GTC GAA CTG CAG CAG CCT GCG GCT GTC GTC AGG CCT GGG GCT TCA GTG AAG CCT TCC TAC ACC TTG ACC

WT-4----
 WT-5----
 WT-6----
 WT-9----
 WT-10----
 WT-11----
 WT-14----
 WT-16----
 WT-17----
 WT-18----
 WT-19----
 WT-20----
 WT-21----
 WT-22----

CDR1

CDR2

図 10 の続き 2

図 10 の続き 3

५

図 10 の続き 4

図 10 の続き 5

67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
K	A	T	L	T	V	D	K	P	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	C	A	R	
AAG	GCC	ACA	CITG	ACT	GTA	GAC	AAA	CCC	TCC	AGC	ACA	GTC	TTC	ATG	CAG	CTC	AGC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GCG	GAC	TCT	GCG	TAT	TAT	TGT	GCA	AGA

図 1 1 A

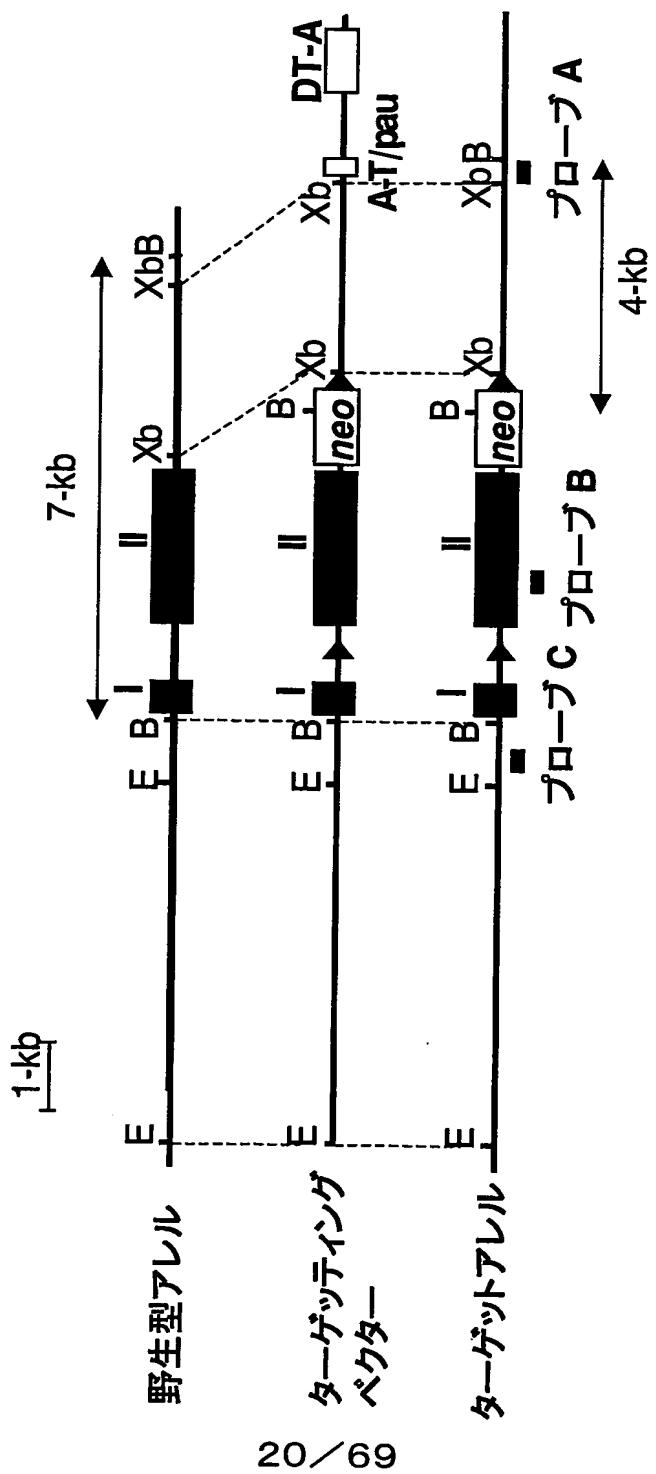


図 11B

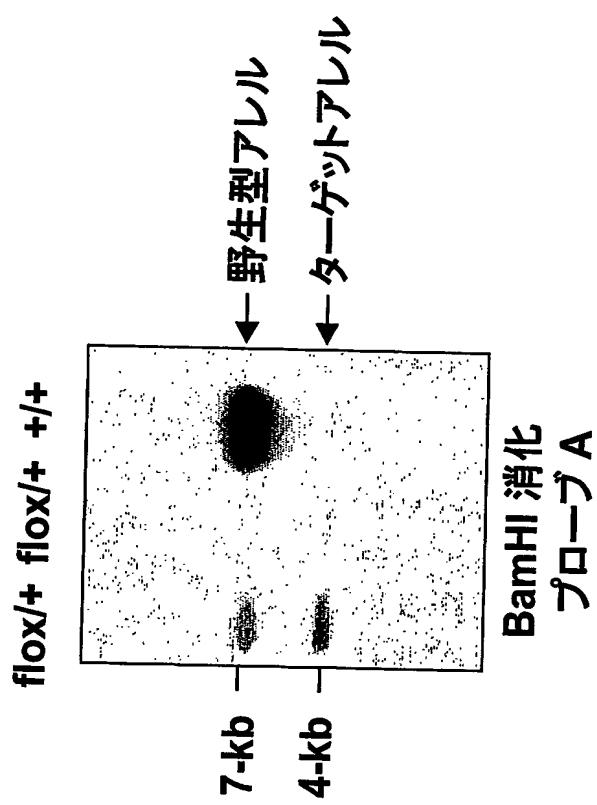


図 1 1 C

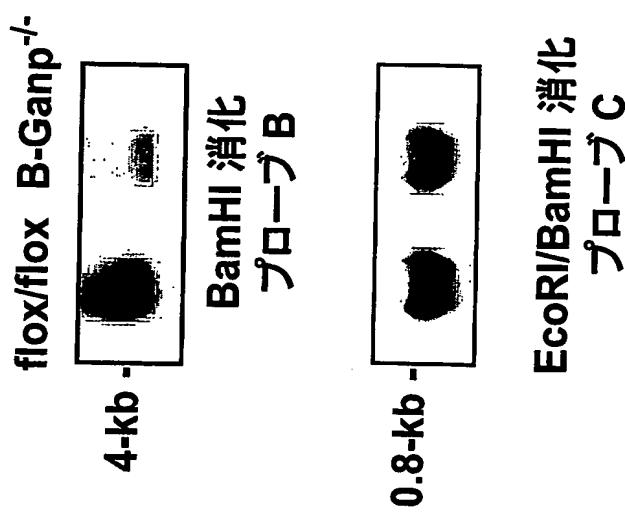


図 1 1 D

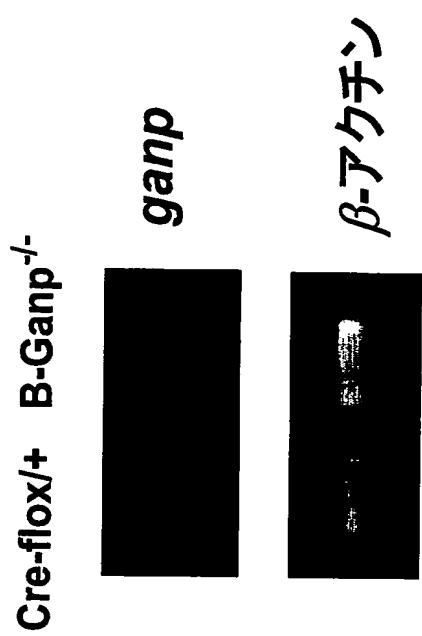


図 1 1 E

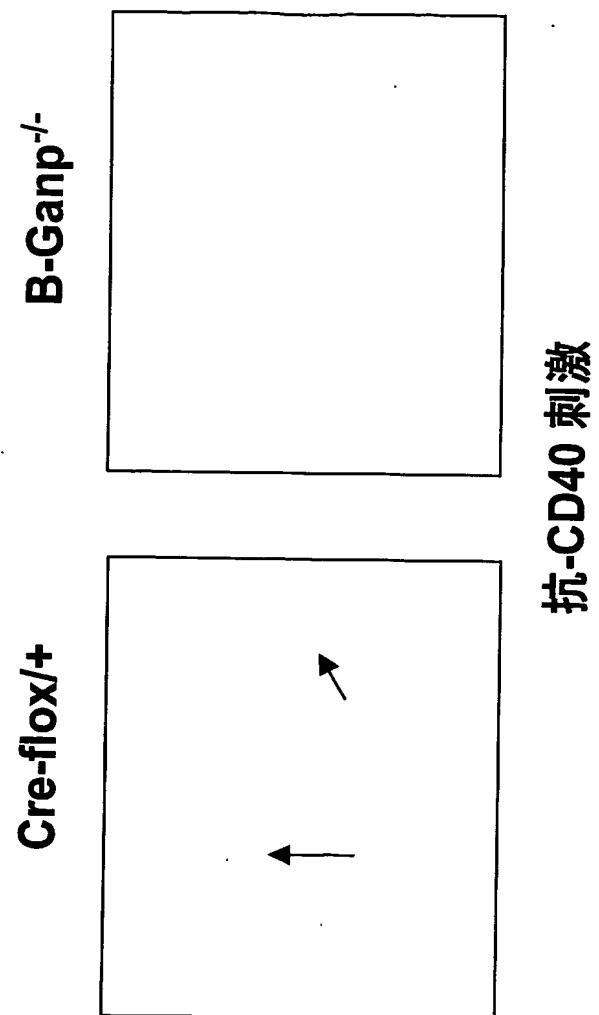


図 12

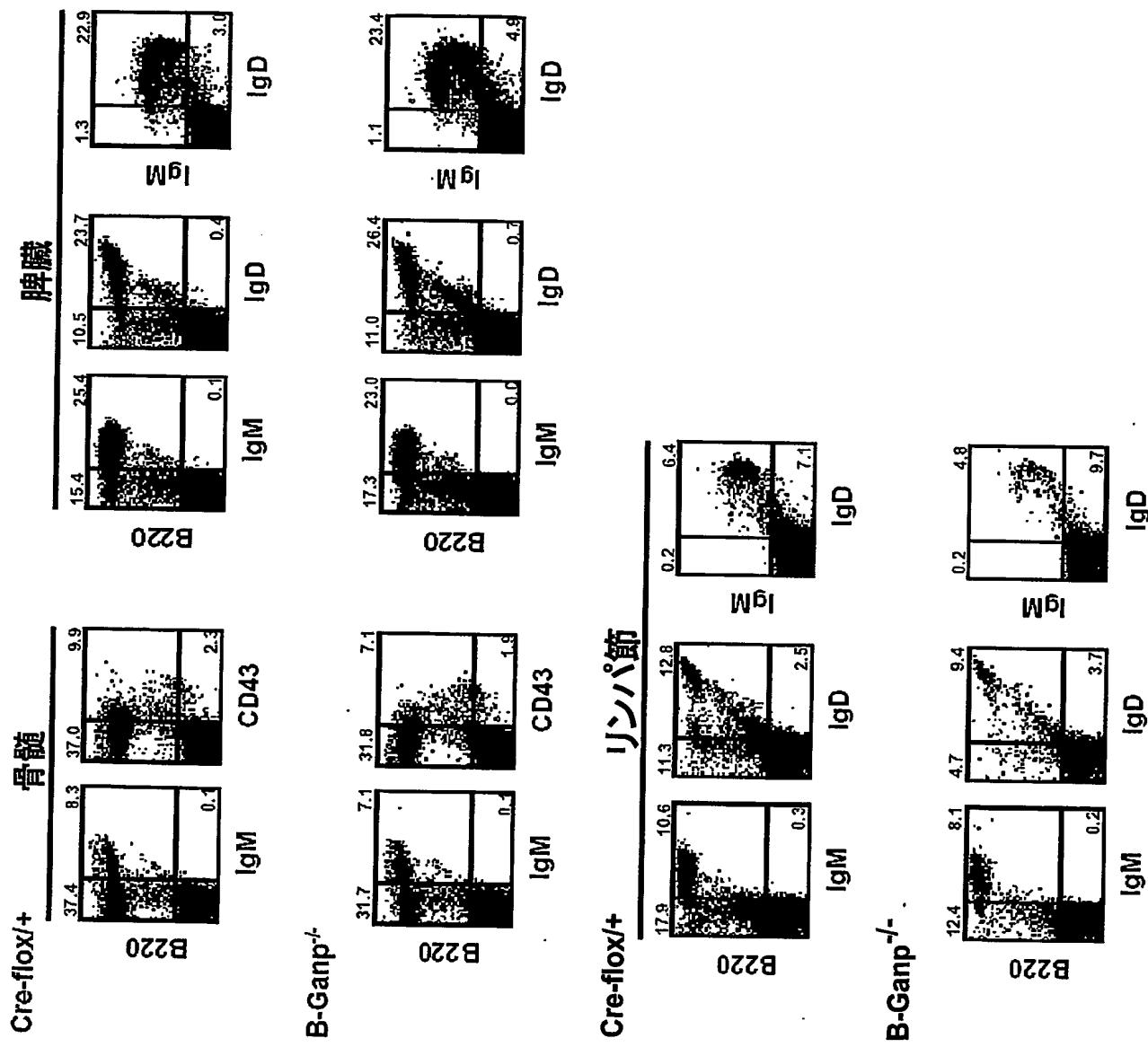


図 1 3

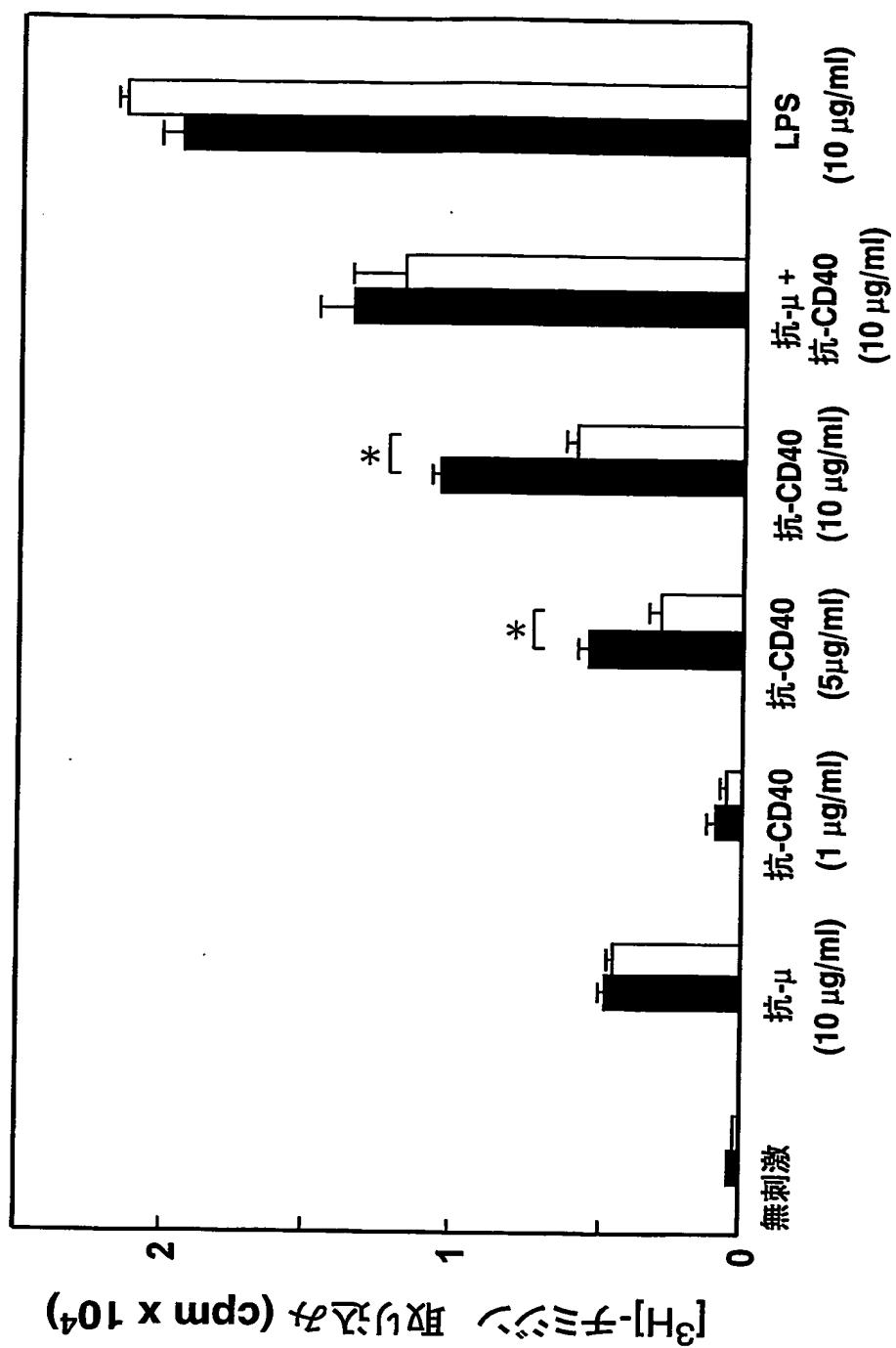


図 1 4

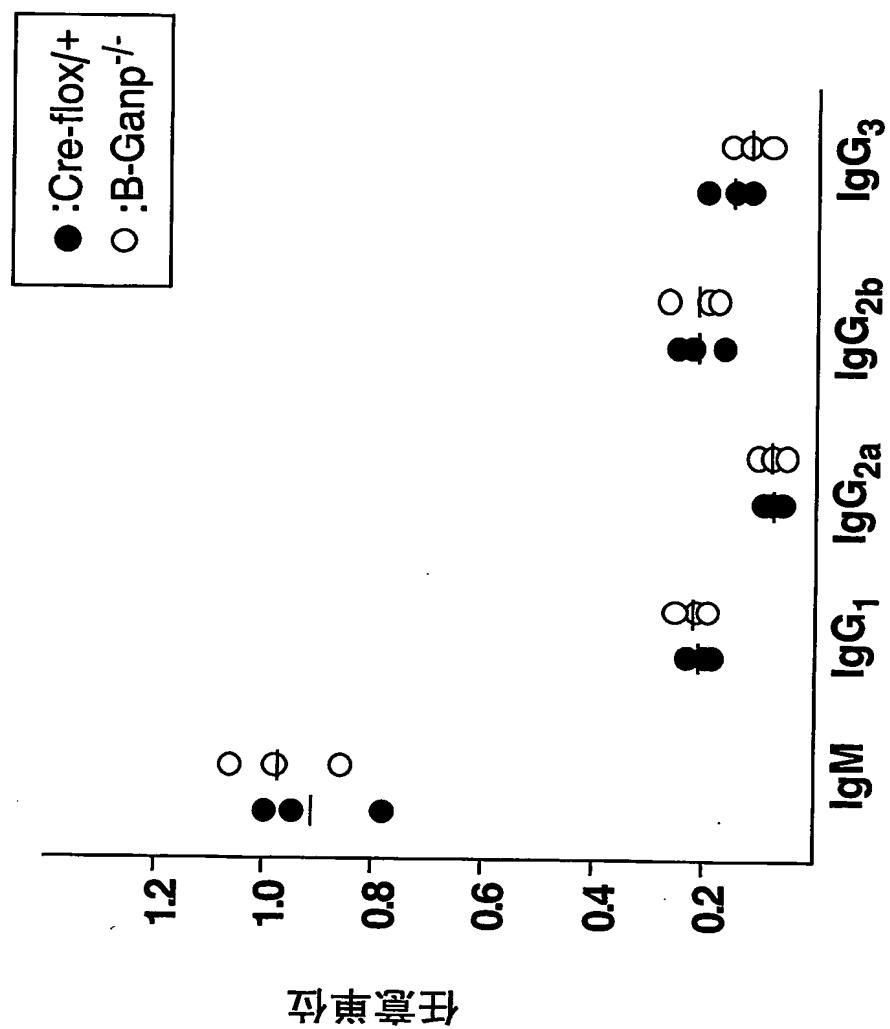


図 15

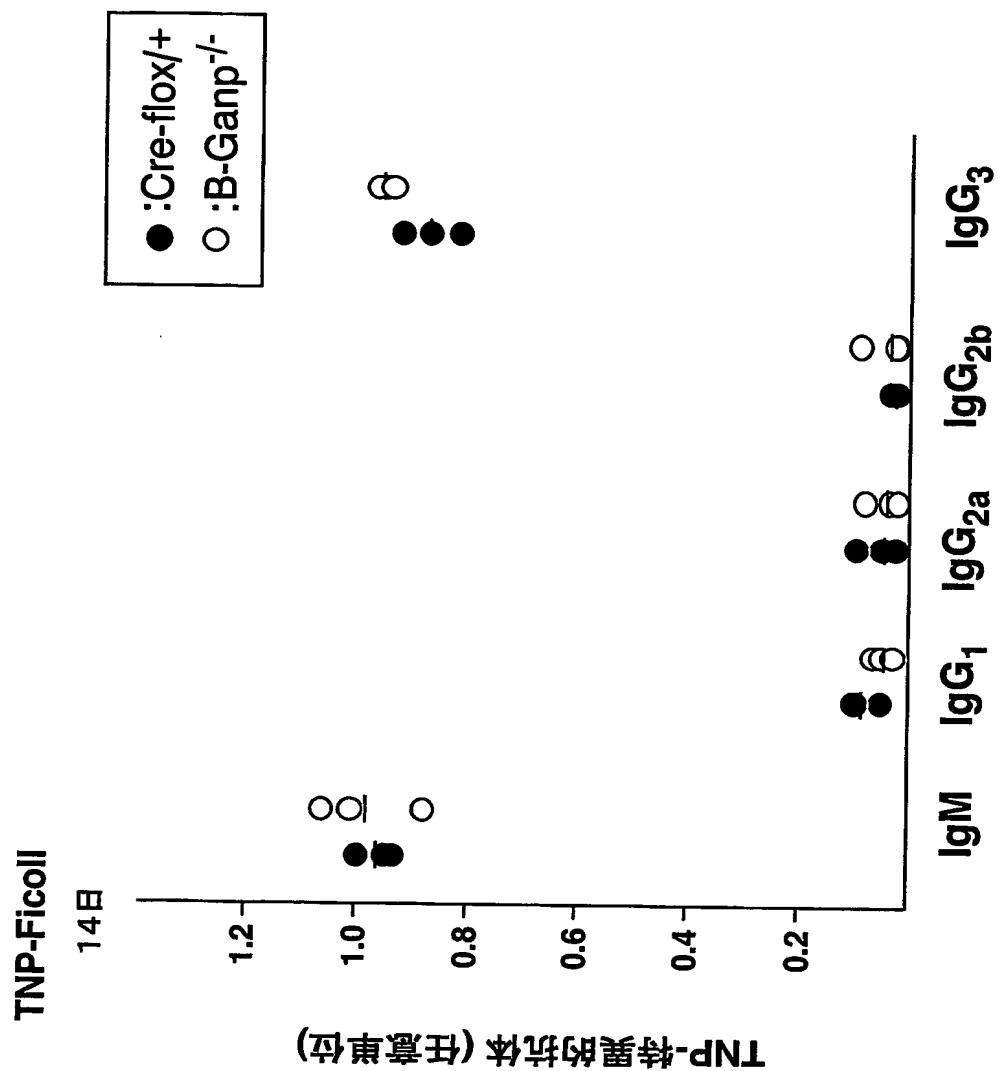


図 16

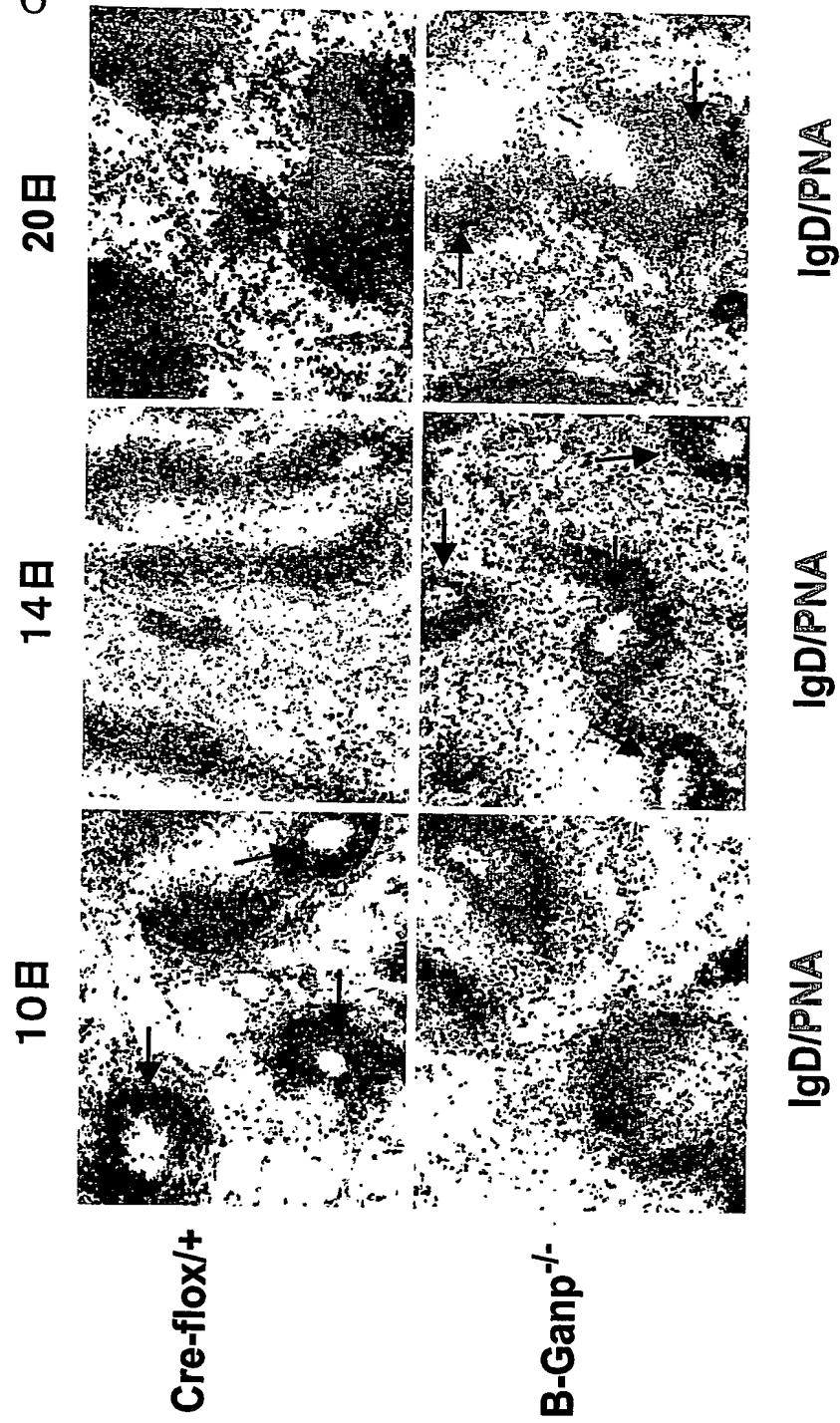


図 17

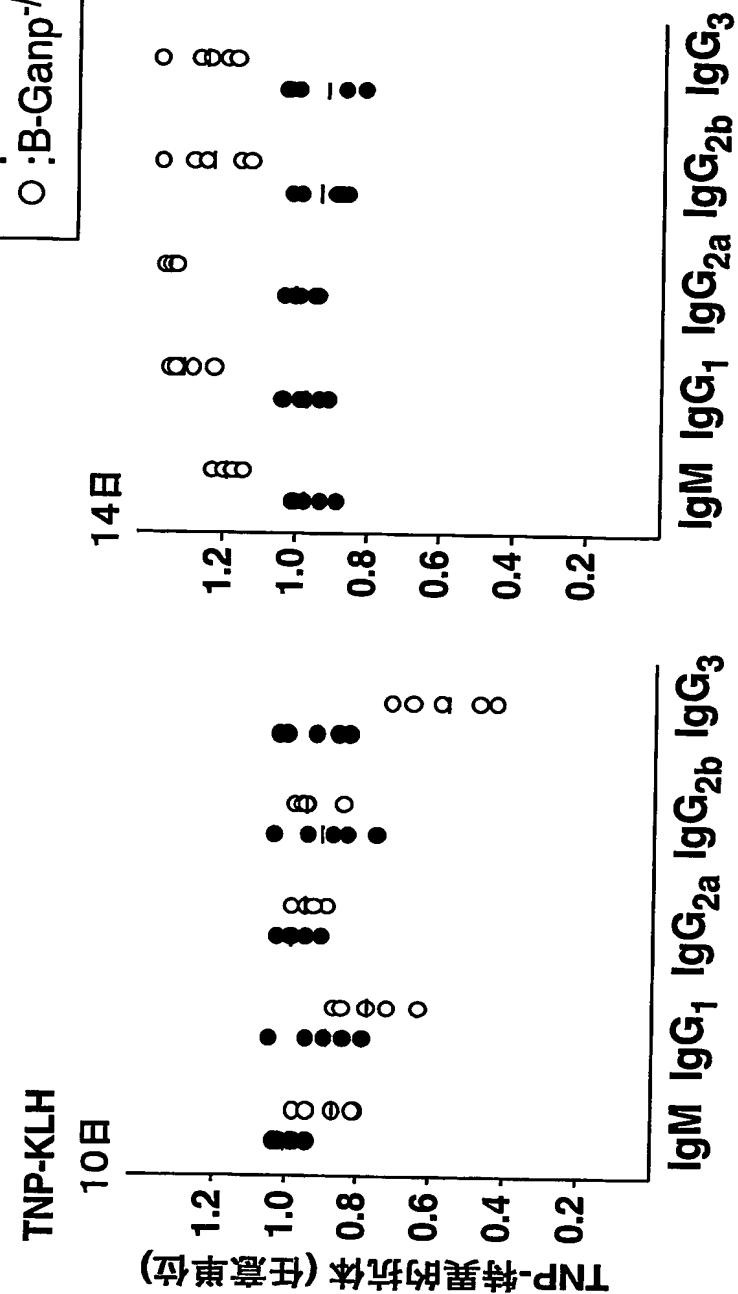


図 18

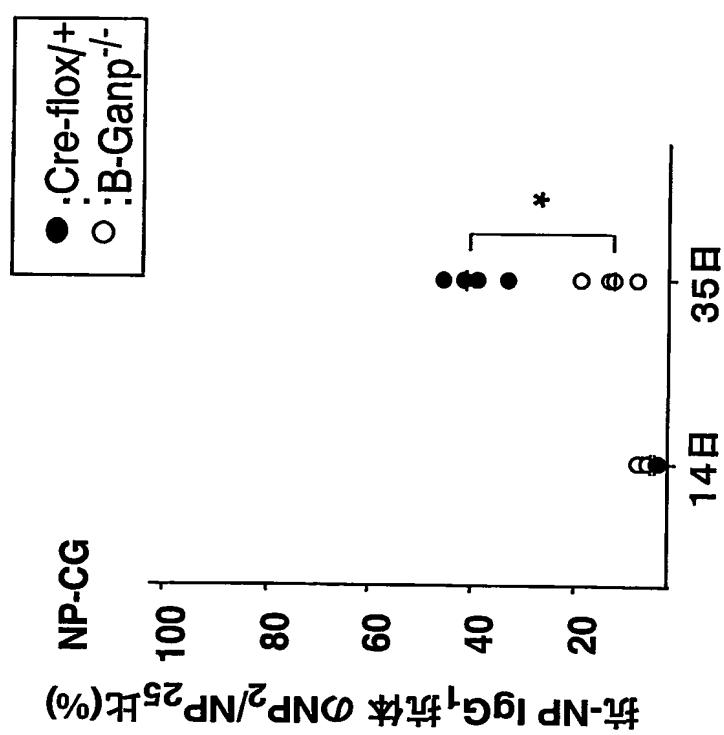


図 19

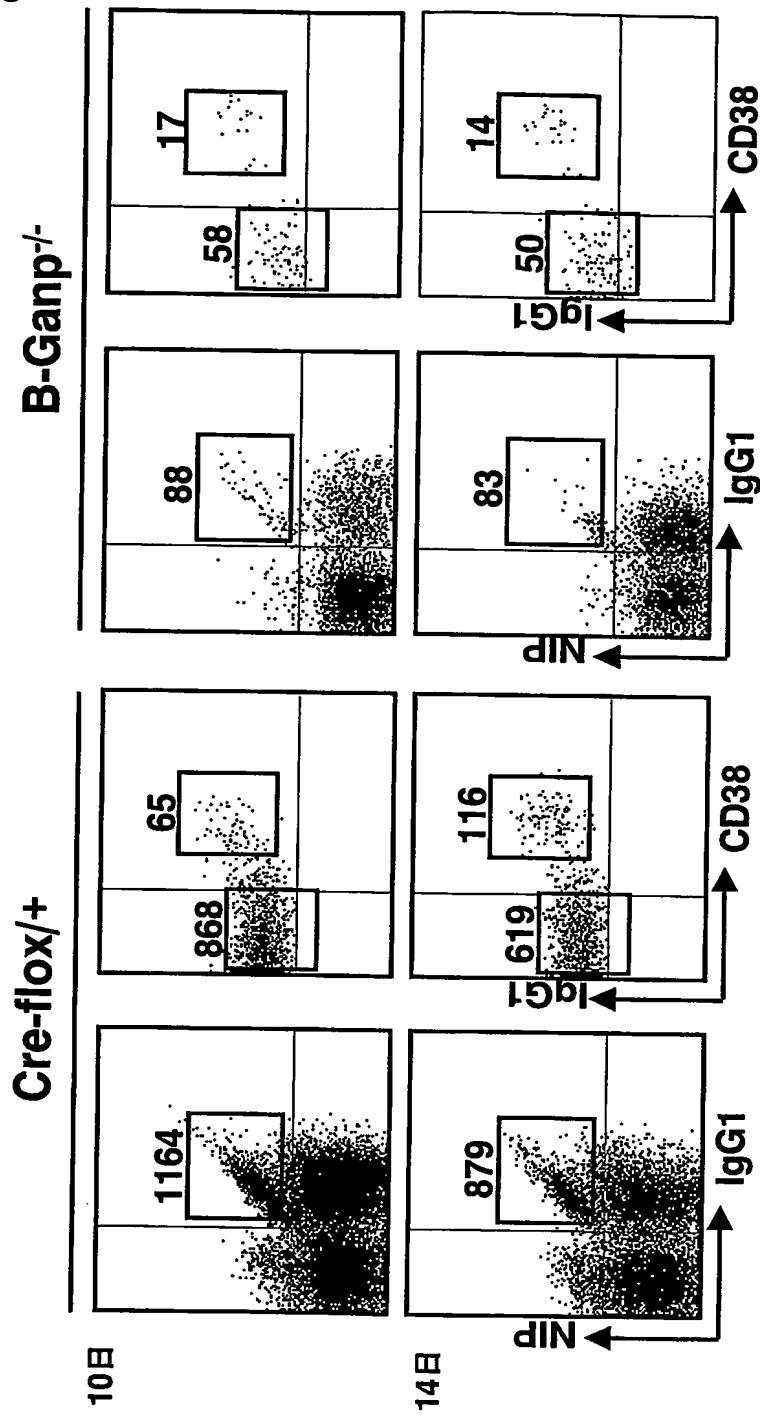


図 20 A

Cre-flox/+

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S
	CAG	GTC	CAA	CTG	CAG	CAG	CCT	GGG	GCT	GAG	CTT	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA

1-5 -----

1-6 ----- A -----

3-1 -----

3-2 ----- R ----- G -----

3-3 -----

4-2 ----- G ----- G -----

4-4 ----- G ----- G -----

4-6 -----

1-8 -----

1-10 -----

4-7 ----- G ----- G -----

6-1 ----- T A -----

6-2 ----- A G -----

7-1 -----

図 20B

Cre-flox/+

18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H
GTG	AAG	CTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	TTC	ACC	AGC	TAC	TGG	ATG	CAC
I								A									
---	-TT	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	-T	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	R	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	A	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	L	I
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	T	T
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	I	*	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A	G	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L	T	L
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	TA	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	C	L
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L	T	L
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	C	TA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L	T	L
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	L	L
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	TA	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	A	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	L	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	T	T
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L	T	L
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	TA	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	F	L	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	T	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	V	T	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	T	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	N	L	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A	T	---

図20C

Cre-flox/+

36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
W	V	K	Q	R	P	G	R	G	L	E	W	I	G
TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GGA	CGA	GGC	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA

This image shows a template for handwriting practice. It consists of ten identical sets of horizontal lines. Each set includes a solid top line, a dashed midline, and a solid bottom line, providing a guide for letter height and placement.

図 2 O D

Cre-flox/+

50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
R	I	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	K
AGG	ATT	GAT	CCT	AAT	AGT	GGT	GGT	ACT	AAG	TAC	AAT	GAG	AAG	TTC	AAG	AGC	AAG

1-5 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

1-6 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

3-1 --- --- --- --- --- --- A D A --- --- --- --- --- --- --- --- ---

3-2 --- --- --- TG M C S G R Y T-C --- --- --- --- --- --- ---

3-3 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

4-2 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

4-4 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

4-6 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

1-8 --- --- --- V K A --- --- --- --- S G --- --- --- --- --- ---

1-10 --- G T C --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

4-7 --- --- --- D A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

6-1 --- --- --- --- --- --- --- --- --- T C --- --- N A --- ---

6-2 --- --- --- --- S A --- --- --- --- --- --- T C --- --- ---

7-1 --- --- --- --- --- --- --- --- --- T C --- --- N A --- ---

图 20 E

Cre-flox/+

68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
A	T	L	T	V	D	K	P	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S
GCC	ACA	CTG	ACT	GTA	GAC	AAA	CCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	AGC

T I A I A I A Q C F T N A T

図20F

Cre-flox/+

85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R
AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAT	TGT	GCA	AGA

T D
A - - - - G

-6

-G

-G

図 2 O G

B-Ganp^{-/-}

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S
	CAG	GTC	CAA	CTG	CAG	CAG	CCT	GGG	GCT	GAG	CTT	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA
1-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1-5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1-6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T
													A	-A	-G		
4-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
7-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
8-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
8-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
9-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
9-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
9-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

図 2 O H

B-Ganp^{-/-}

18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H
GTG	AAG	CTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	TTC	ACC	AGC	TAC	TGG	ATG	CAC
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
I									A								
TT									C						T		
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
															N		
									G						A	T	
															N		
															A		
															L		
															T		
															N		
															A		
															F		
															T	A	
															F		
															T	A	
															C		
															G		
															N	L	
															A	T	
															N		
															A		
															T		
															L		
															C		
															T		

圖201

B-Ganp^{-/-}

36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
W	V	K	Q	R	P	G	R	G	L	E	W	I	G
TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GGA	CGA	GGC	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA

図 2 O J

B-Gap^{-/-}

	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
	R	I	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K
	AGG	ATT	GAT	CCT	AAT	AGT	GGT	GGT	ACT	AAG	TAC	AAT	GAG	AAG	TTC	AAG
1-1	---	---	---	---	---	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1-5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1-6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	---	---	---	---	---
2-3	---	T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4-3	N	AT	---	A	---	---	---	---	---	---	C	---	---	---	---	---
4-4	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6-1	---	---	---	---	---	---	G	---	---	T	---	E	---	---	---	---
6-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	---	---	---	---	---
7-1	---	---	---	---	G	---	---	---	---	F	D	---	---	---	---	---
8-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
8-2	---	---	---	---	G	---	---	---	A	---	---	E	---	---	---	---
9-1	---	---	---	---	---	G	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---
9-3	---	---	---	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	---	---	---
9-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

図 20K

B-Gap^{-/-}

66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82
S K A T L T V D K P S S T A Y M Q
AGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA CCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG

--T -----

-----A

A

C

N

-A-----A-----G-----

S

T

T

-C-----

T --A

T

S

T

図 2 O L

B-Gap^{-/-}

83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R
CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAT	TGT	GCA	AGA

----- C -----

----- C -----

----- C -----

----- C -----

----- F -----

T -----

図 2 1

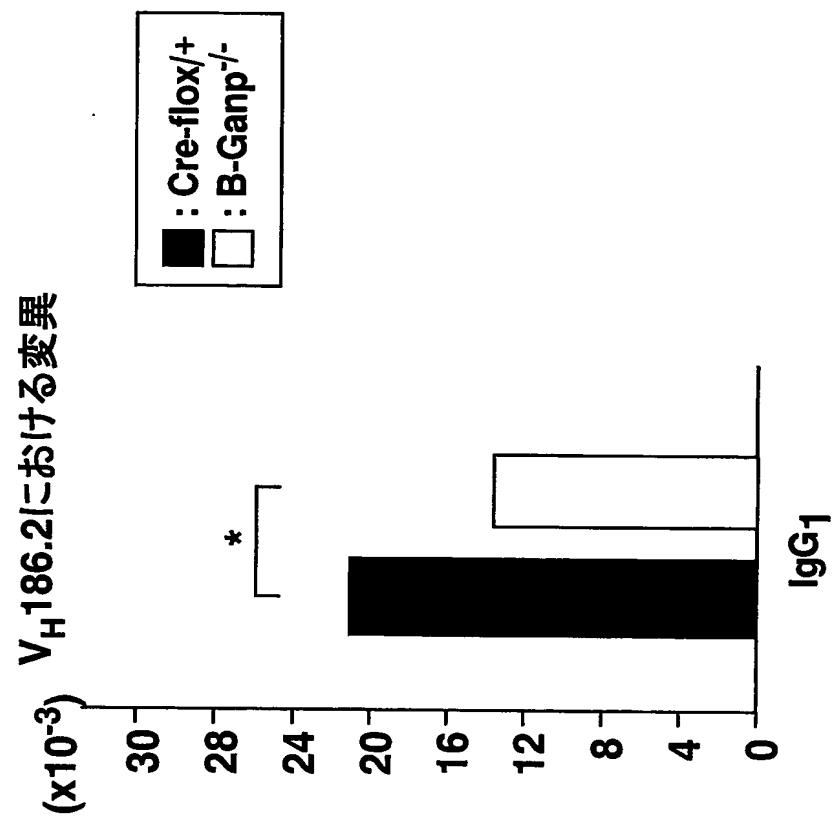


図 22

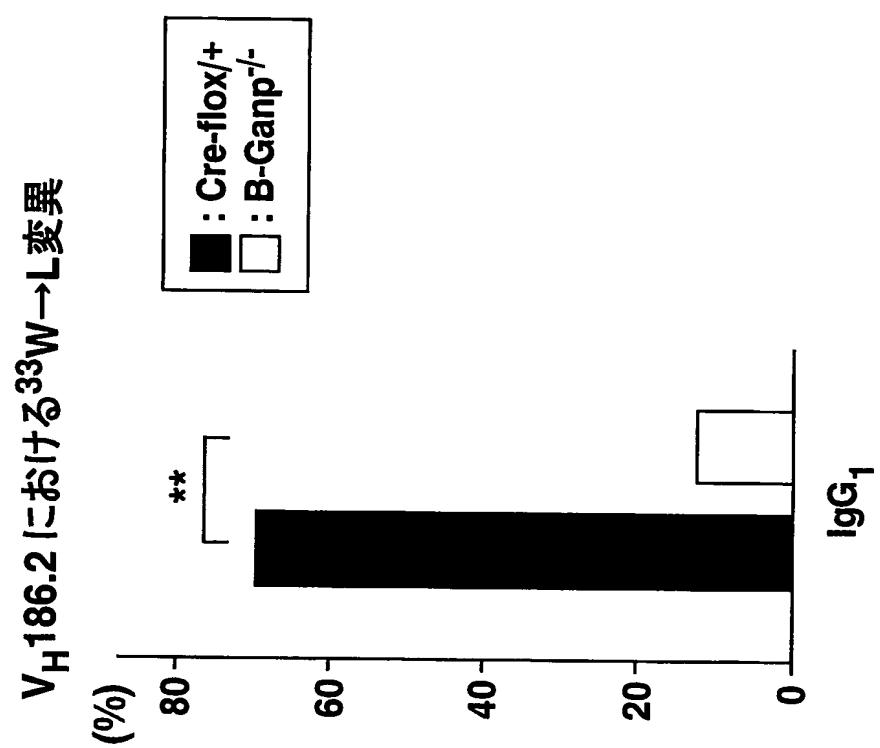


図 2 3

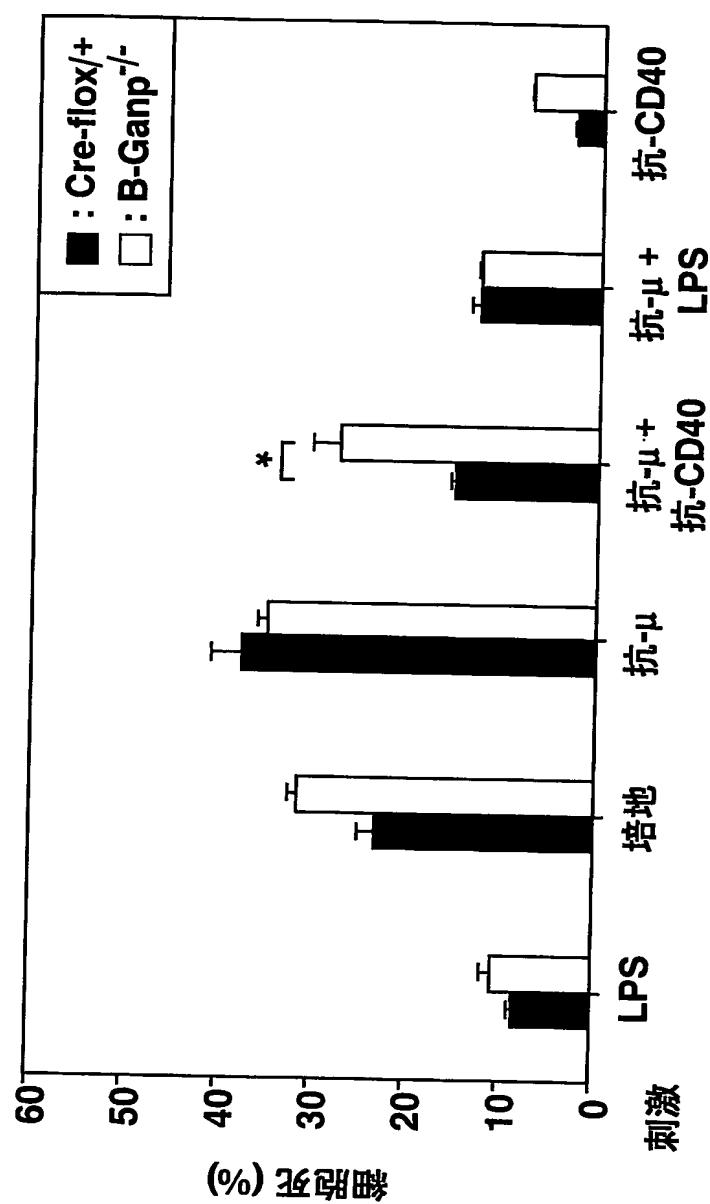


図 24

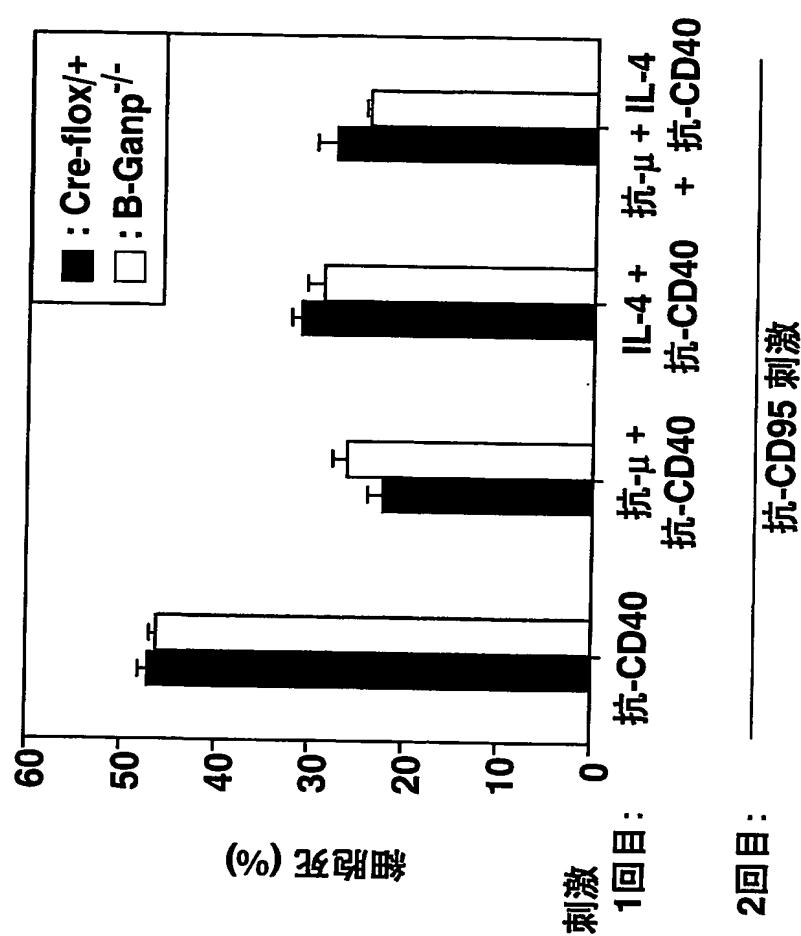


図 25

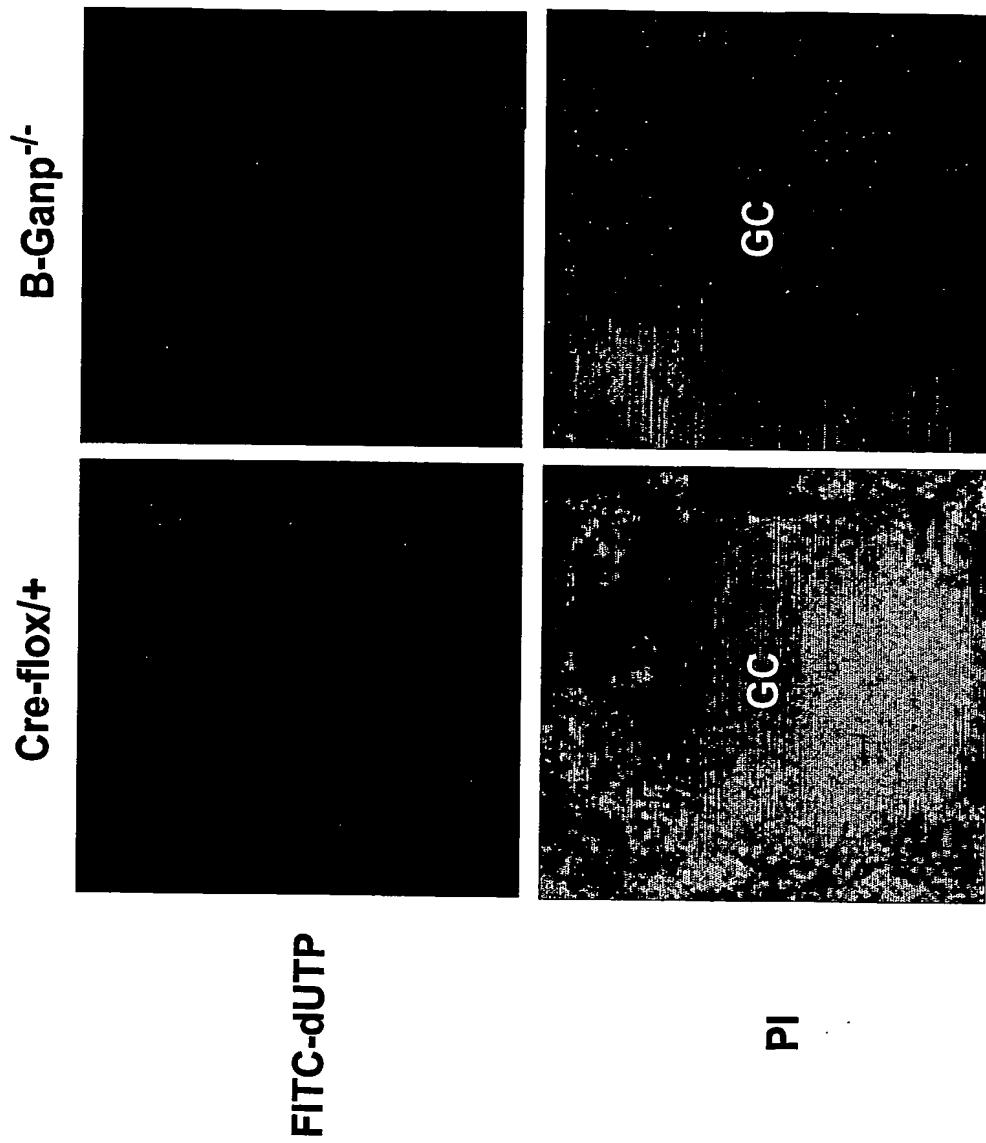


図26

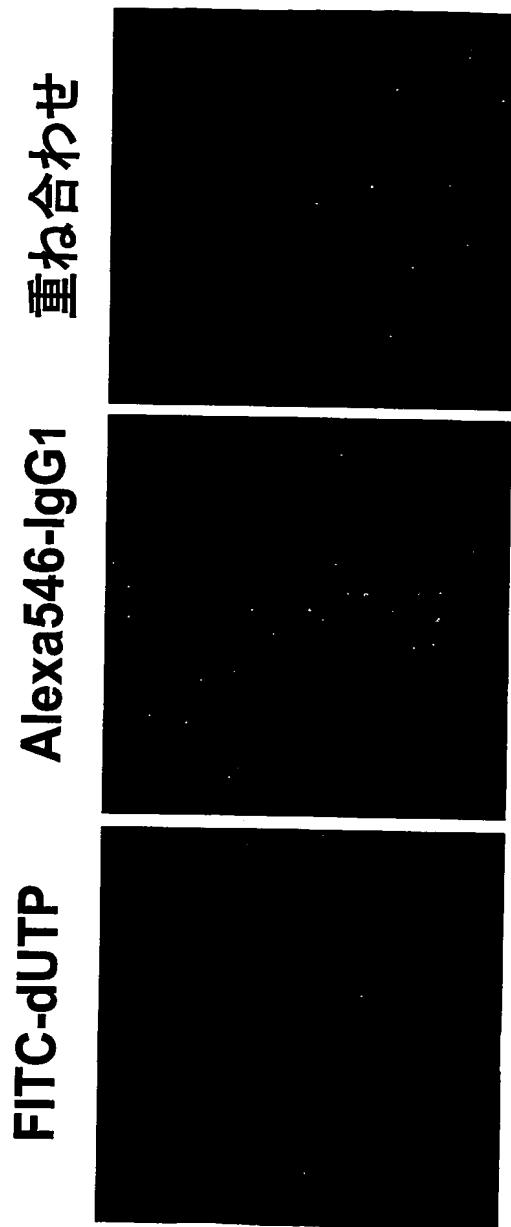


図 27

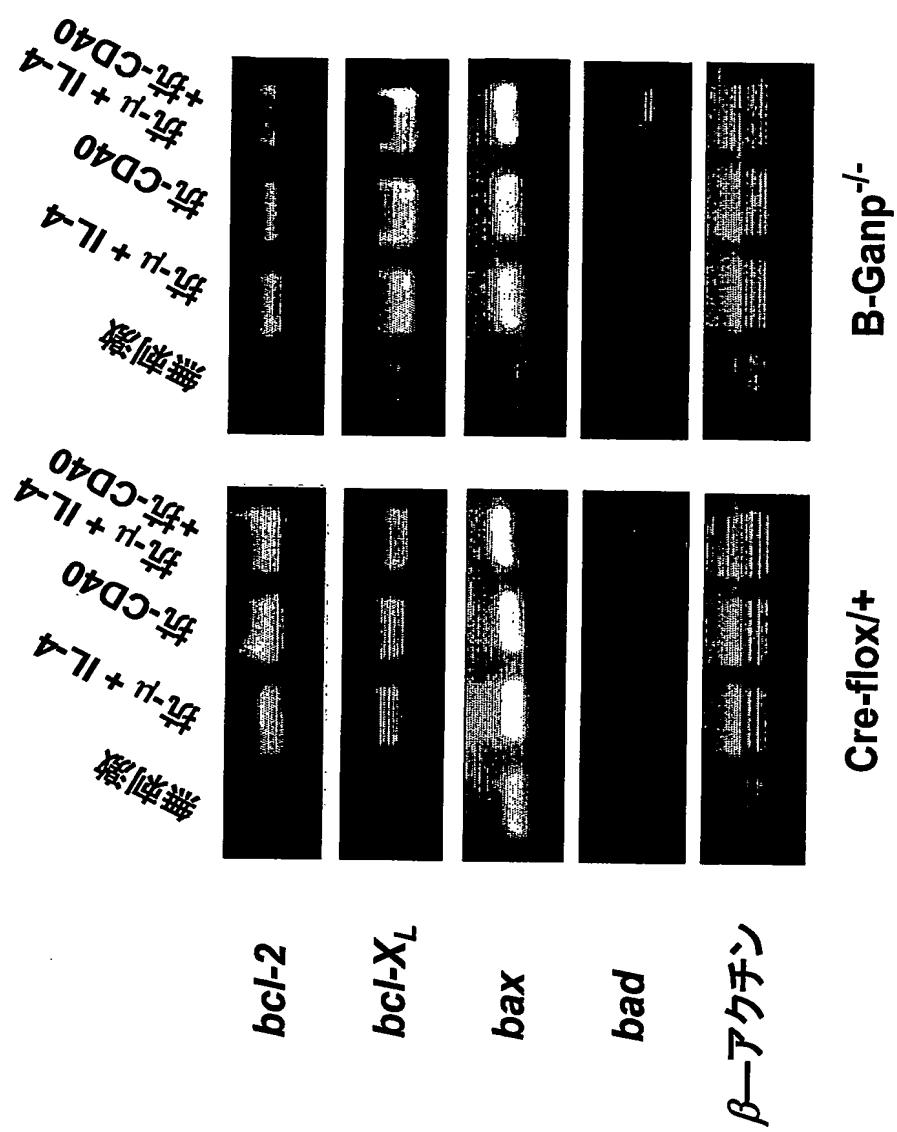


図 28

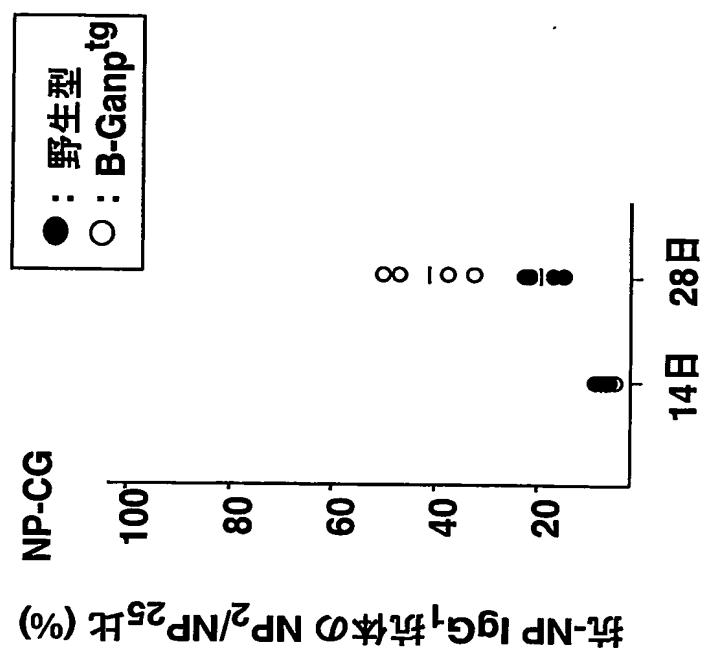


図 2 9

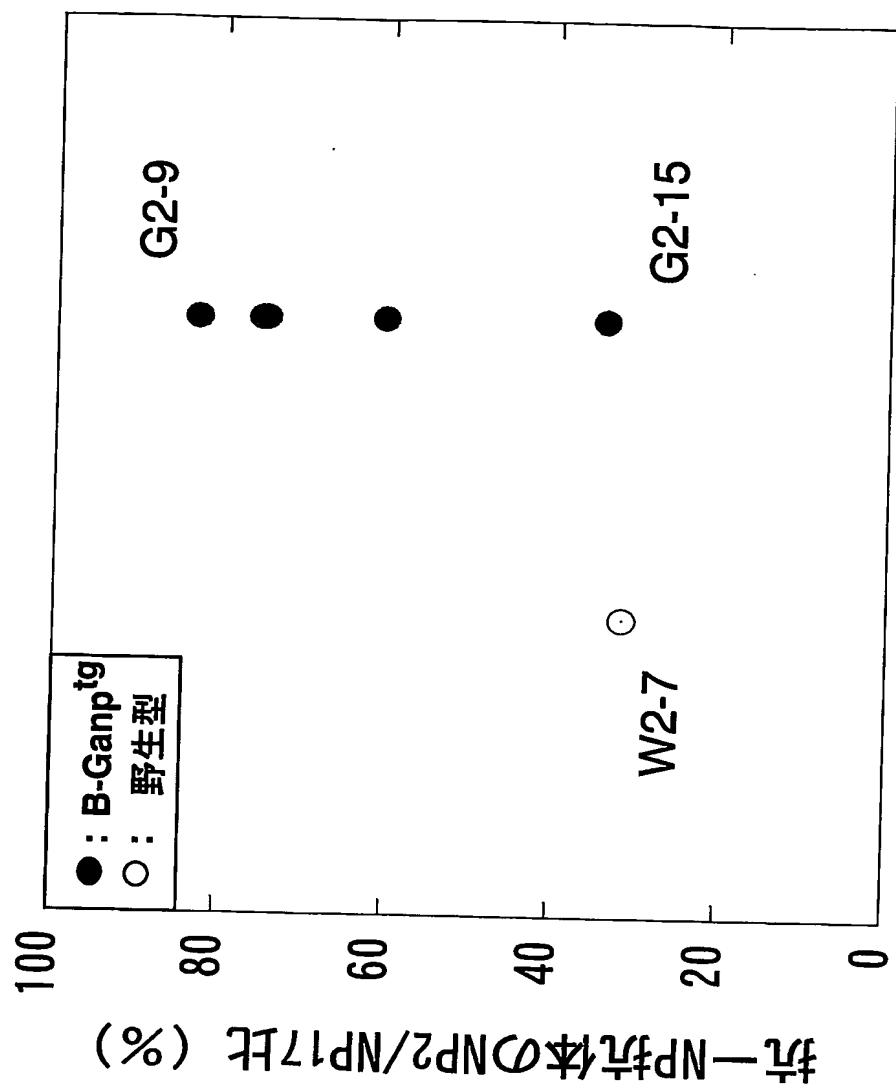
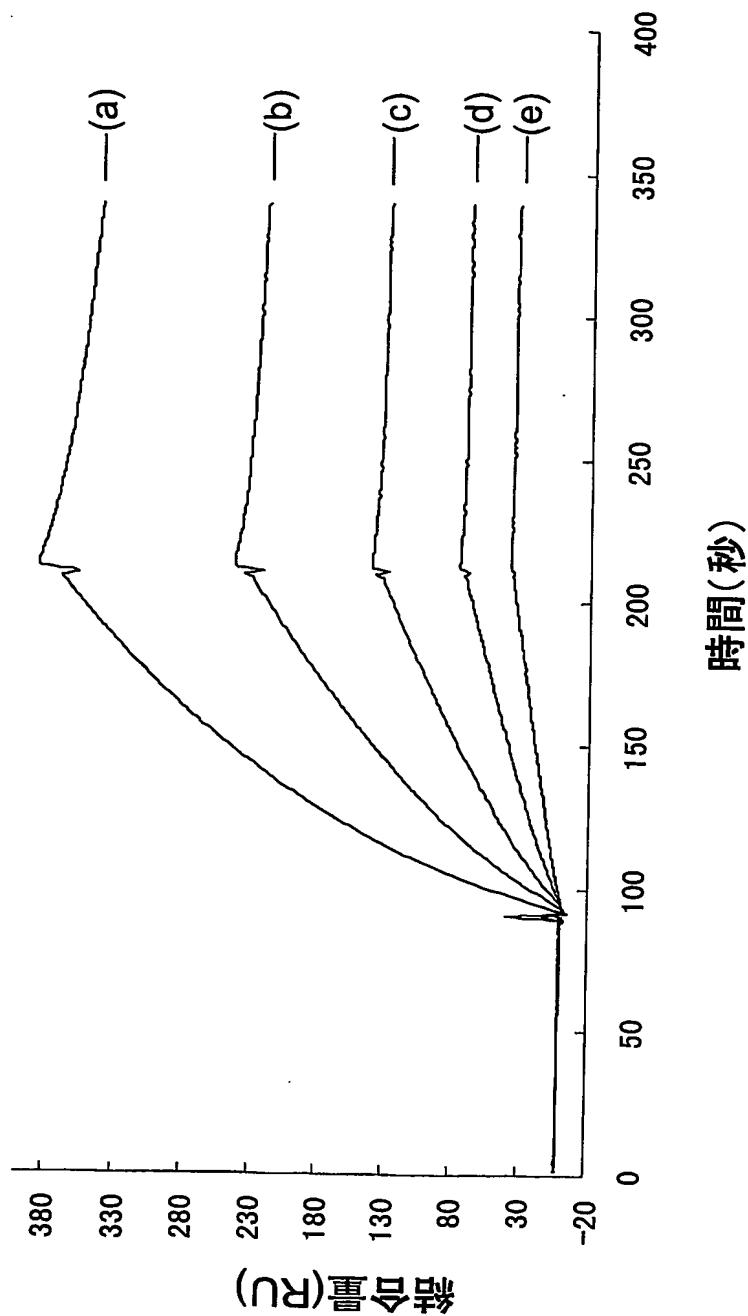


図 30

BIACORE (G2-9, IgG1, κ)

BIACORE (G2-15, IgG1, λ)

図 3 1

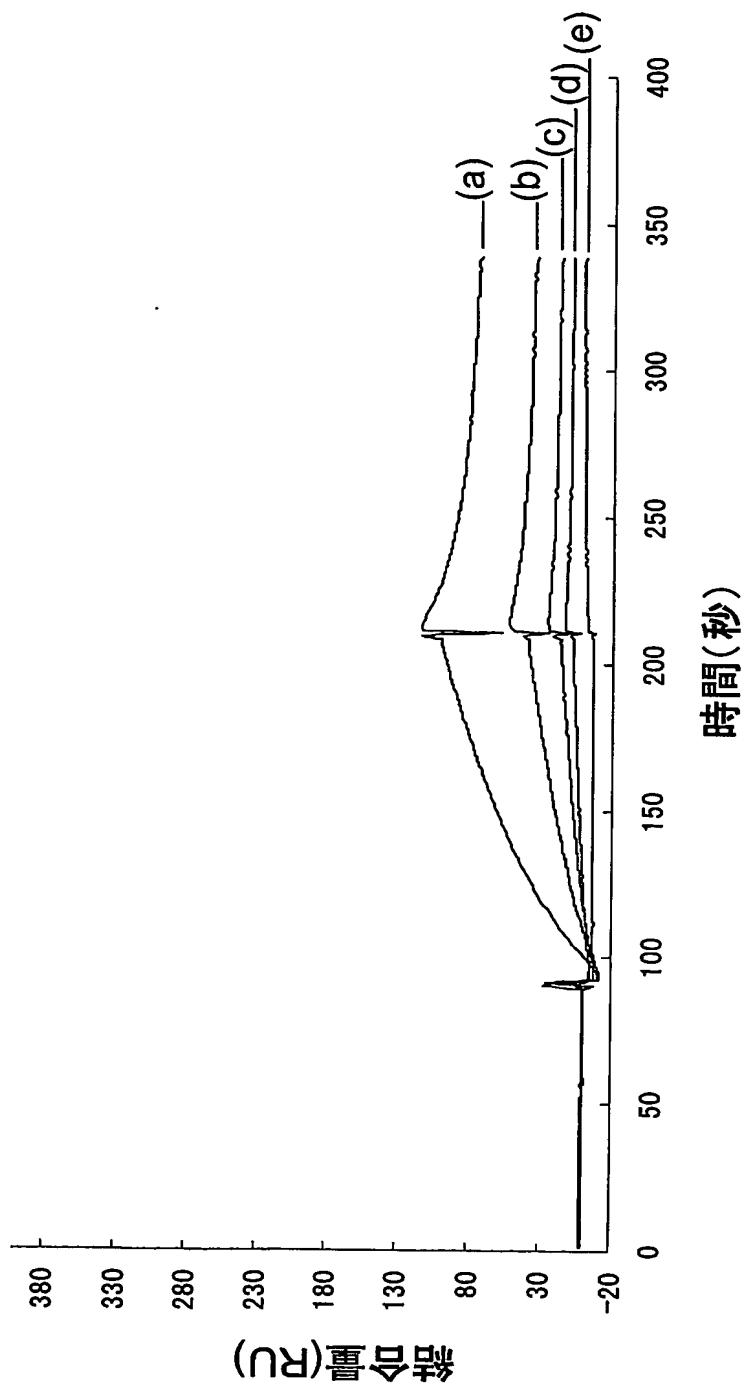


図 3 2

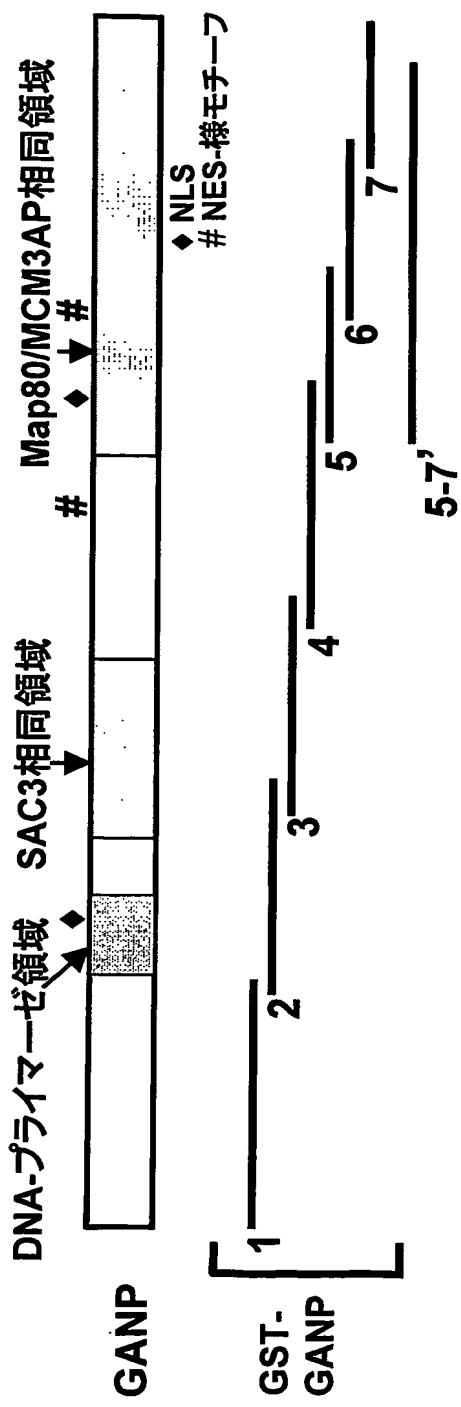


図 3 3

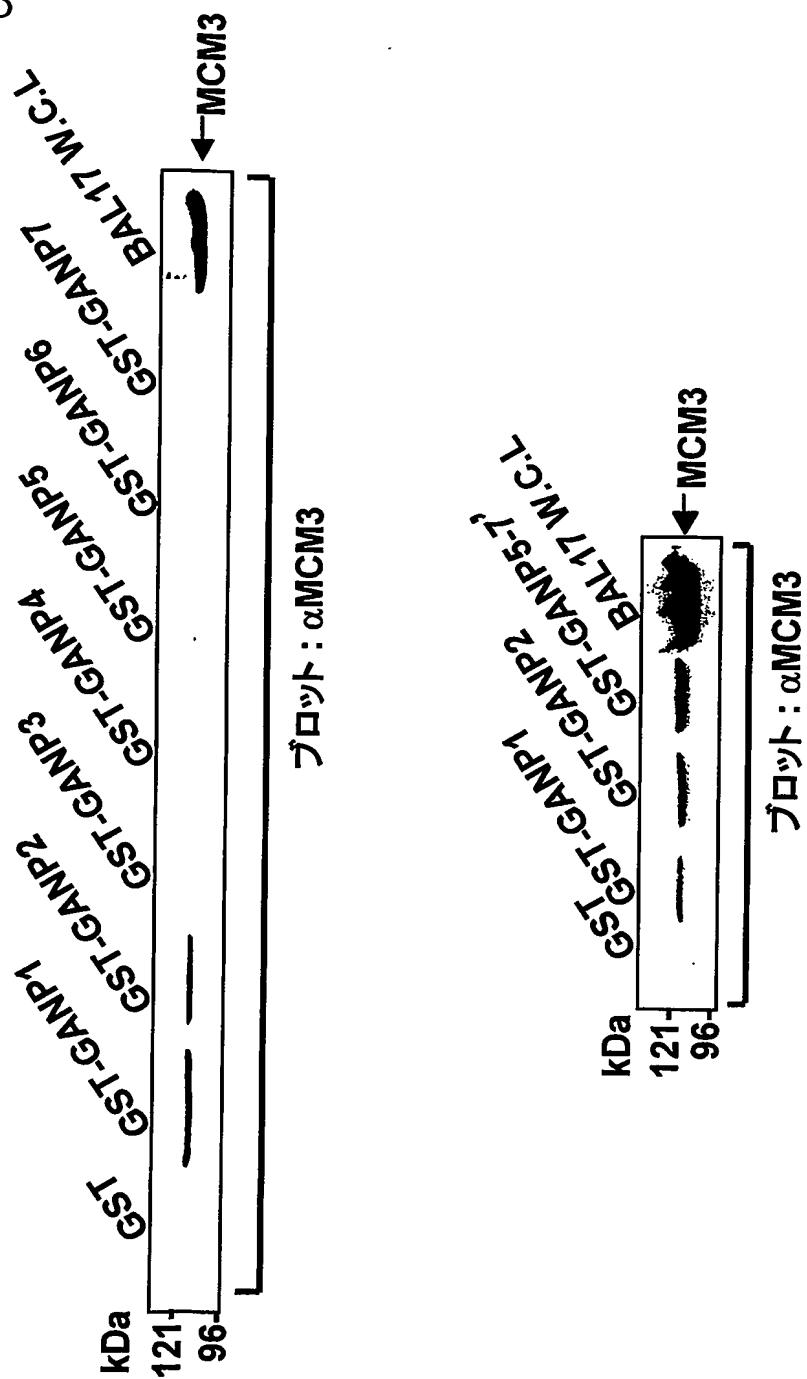


図 3 4

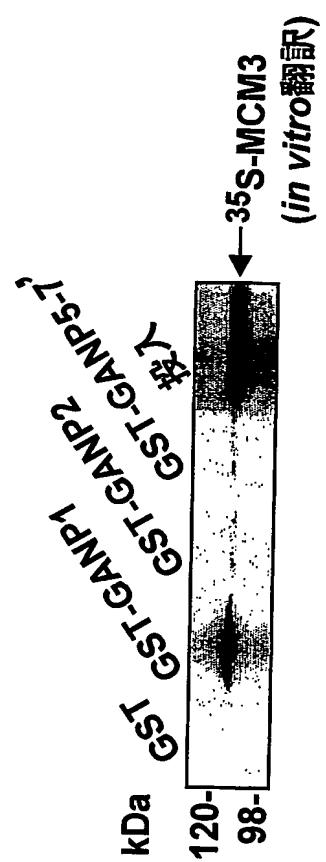


図 3 5

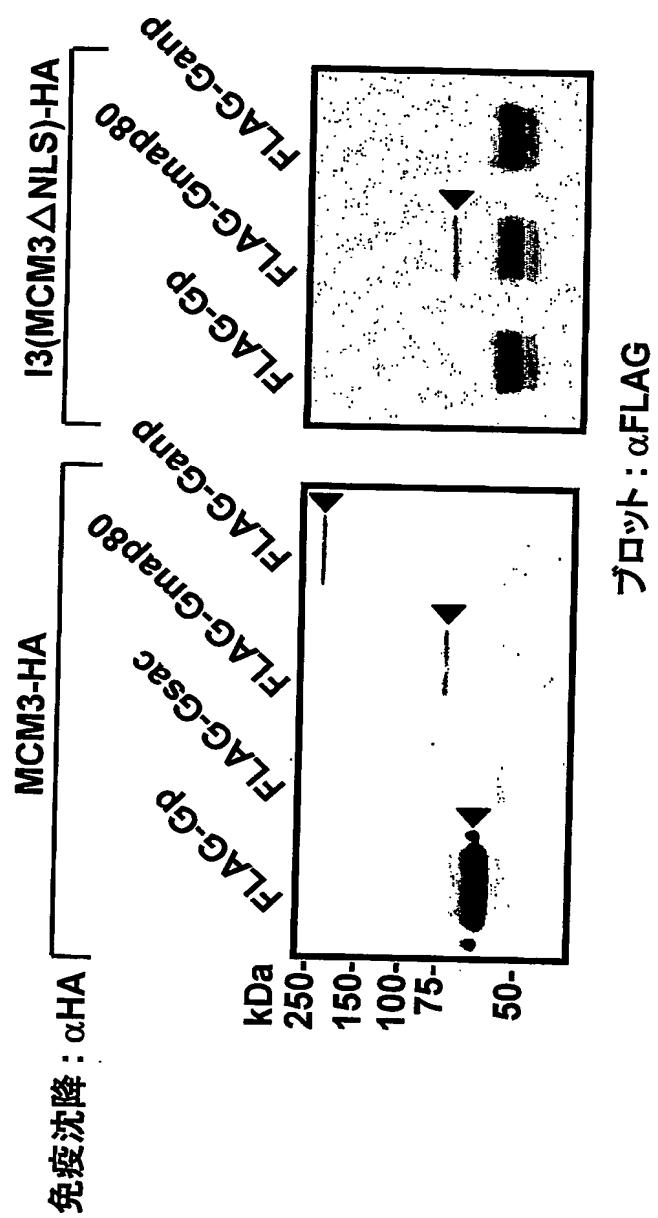


図 3 6 A

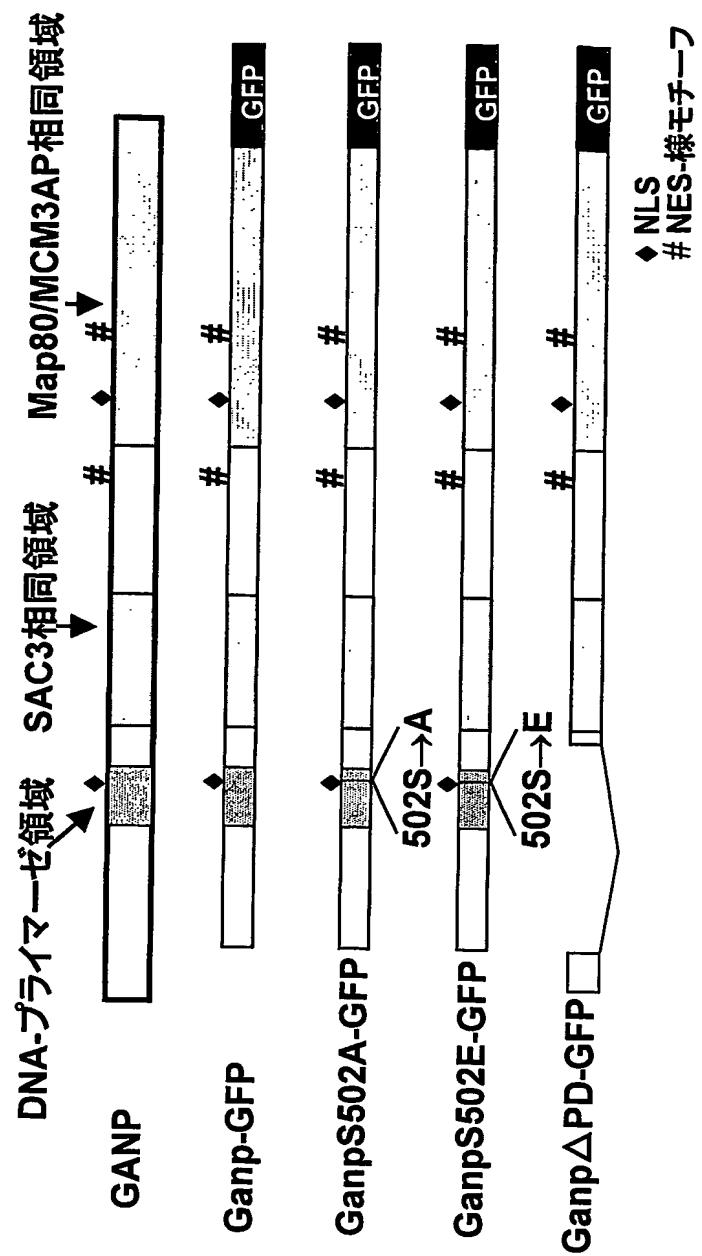


図 3 6 B

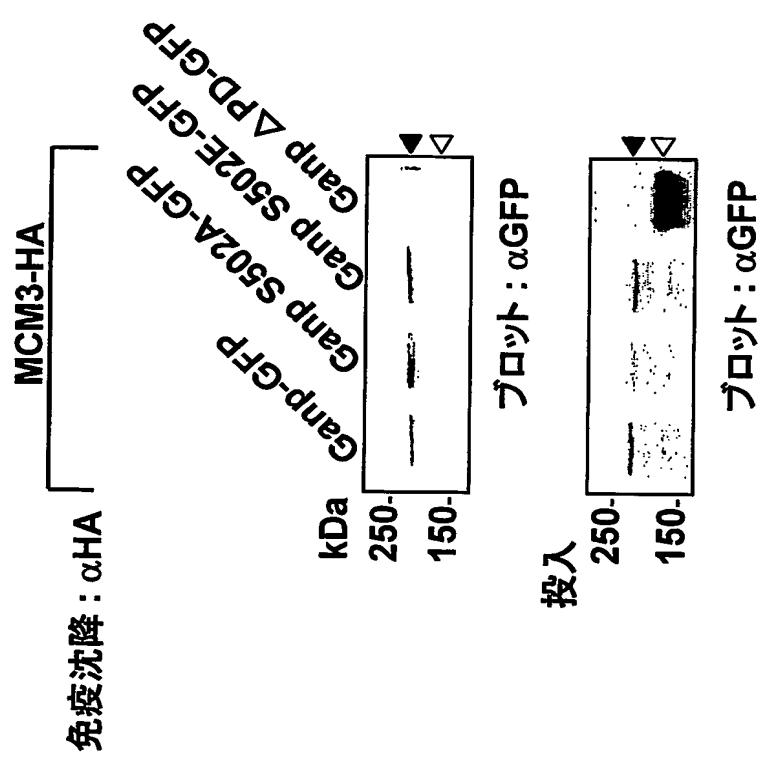


図 3 7

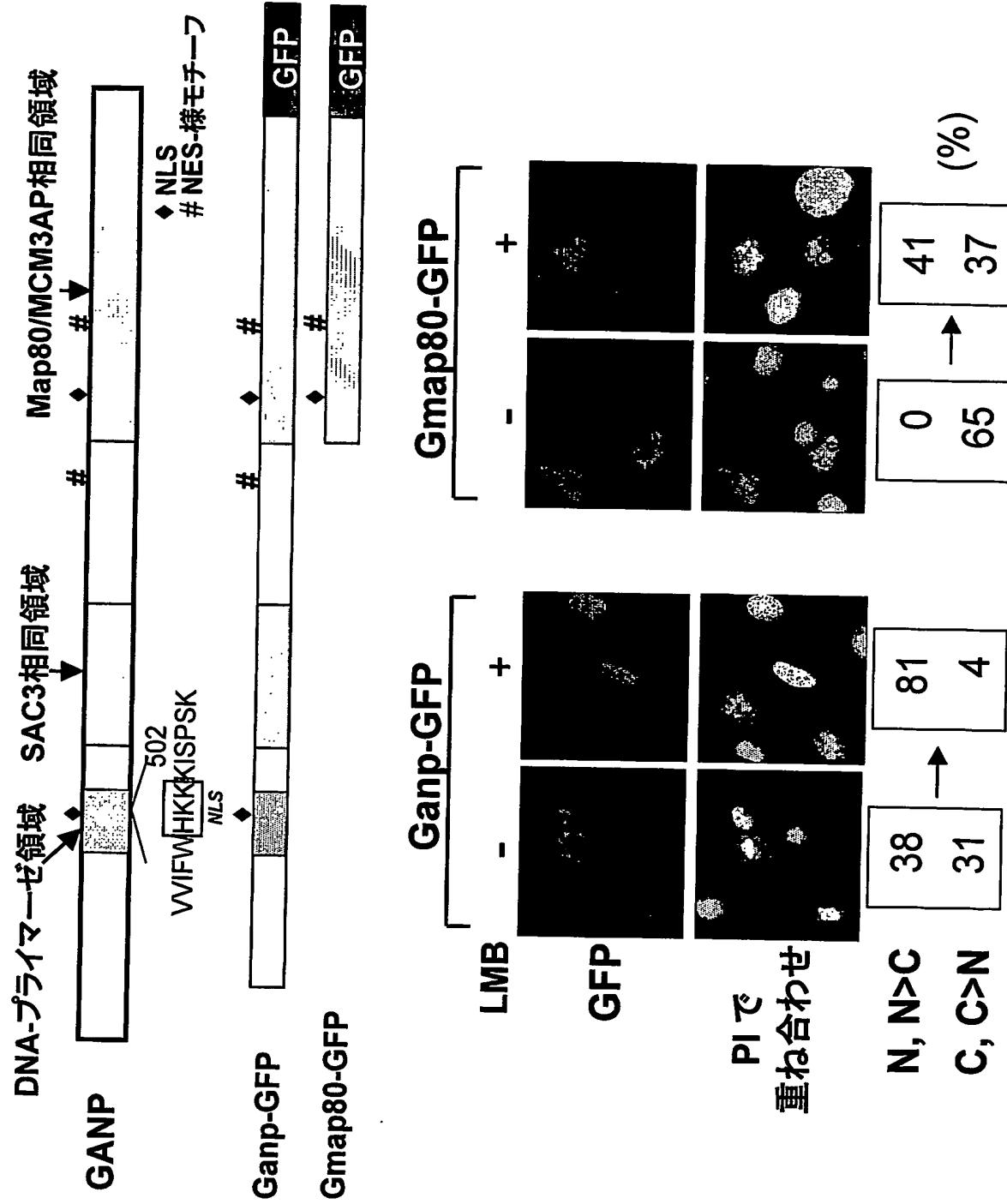


図38

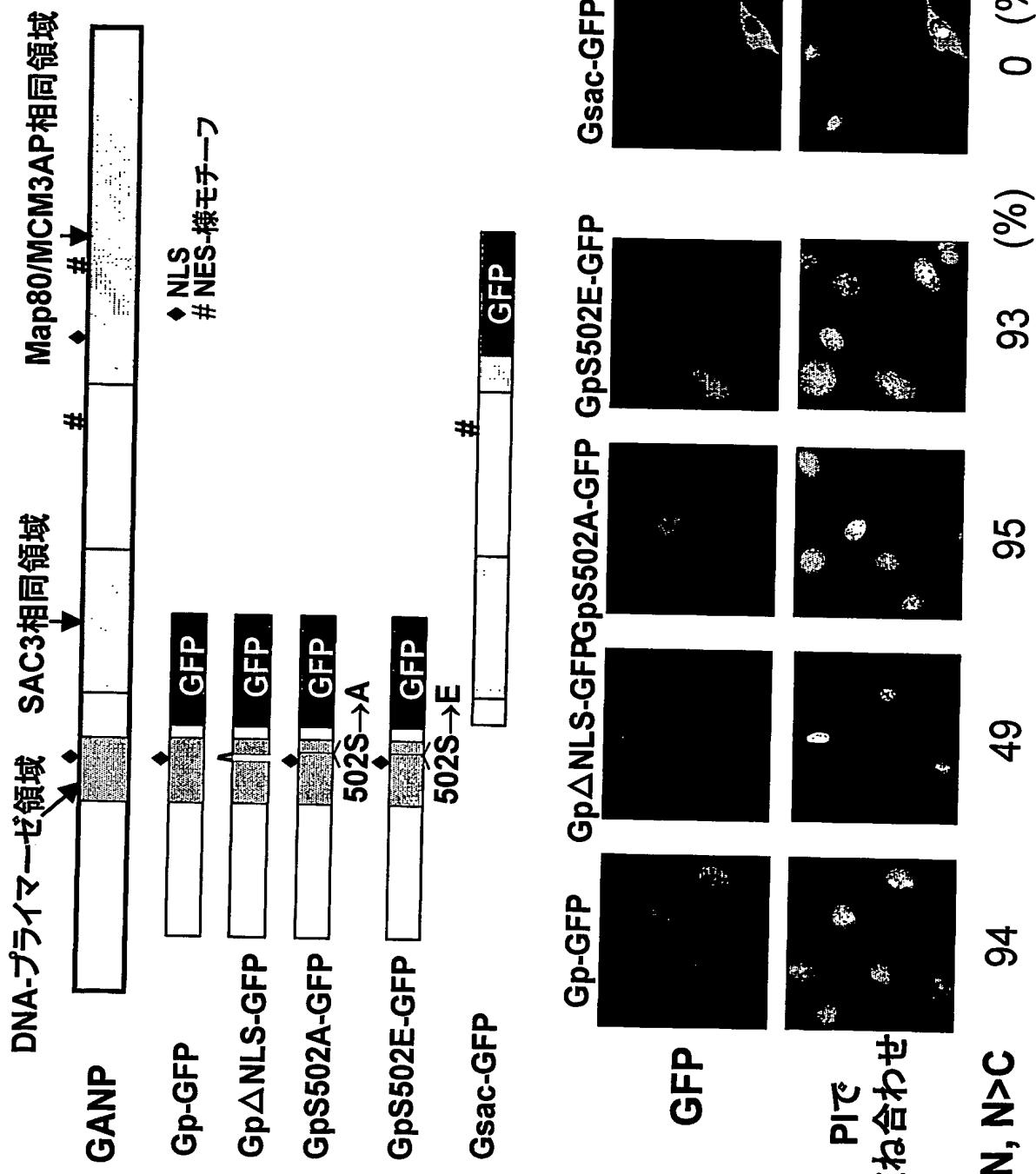


図 3 9

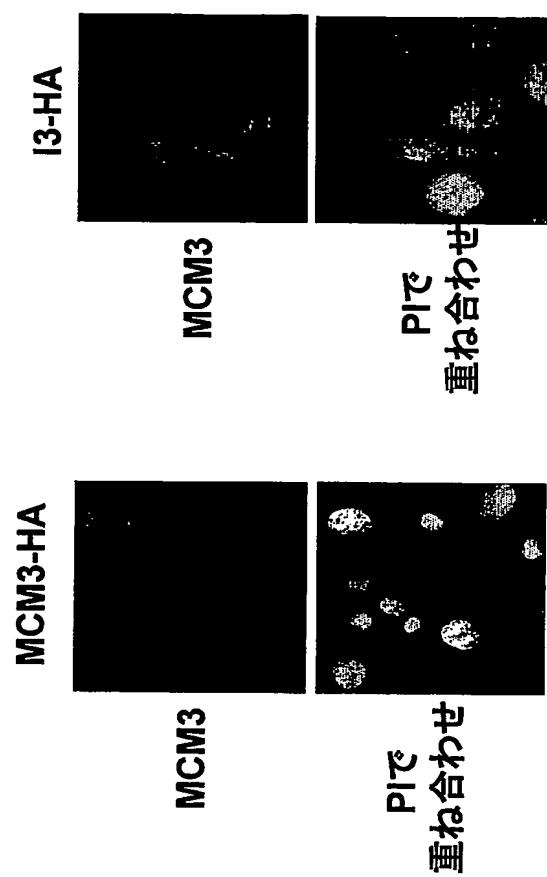


図 40

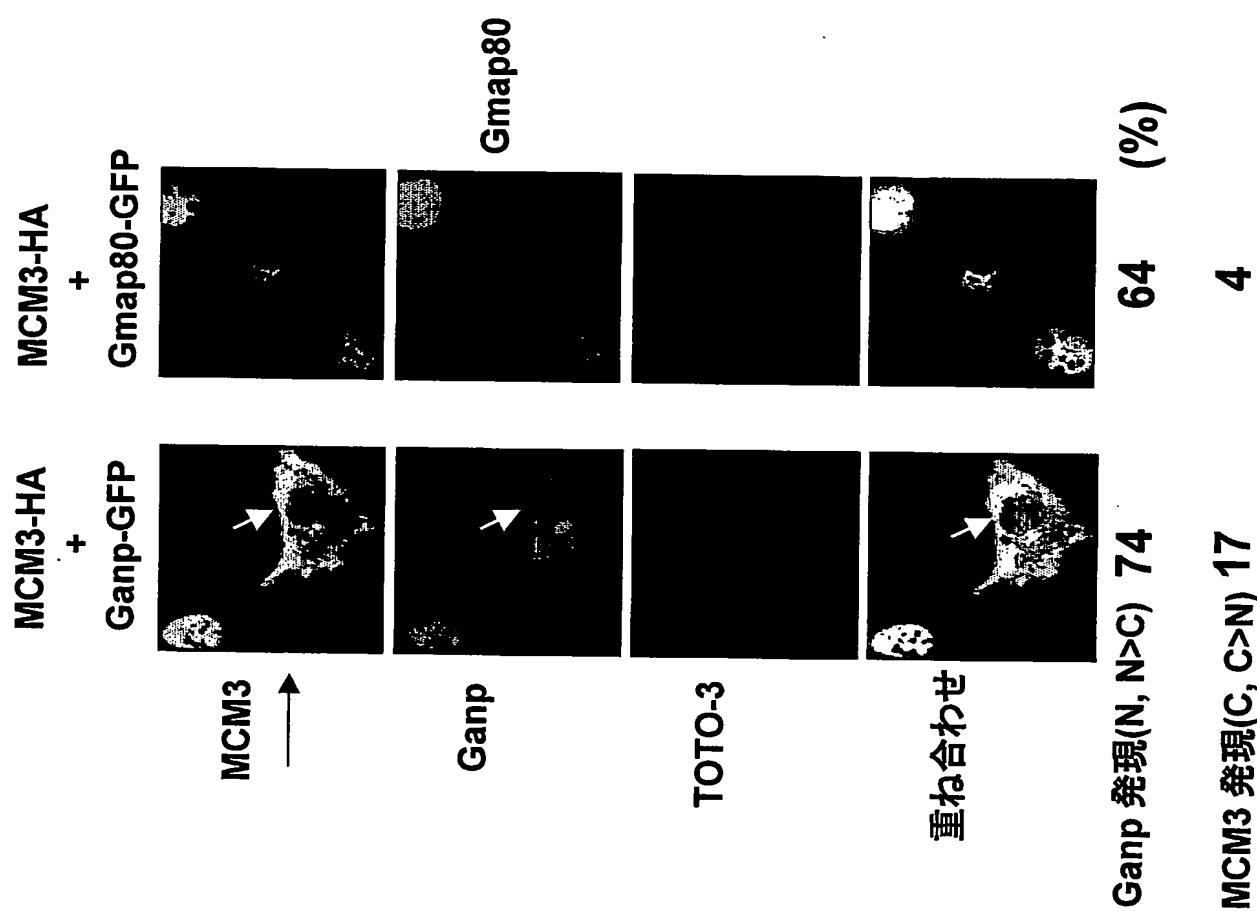


図 4 1

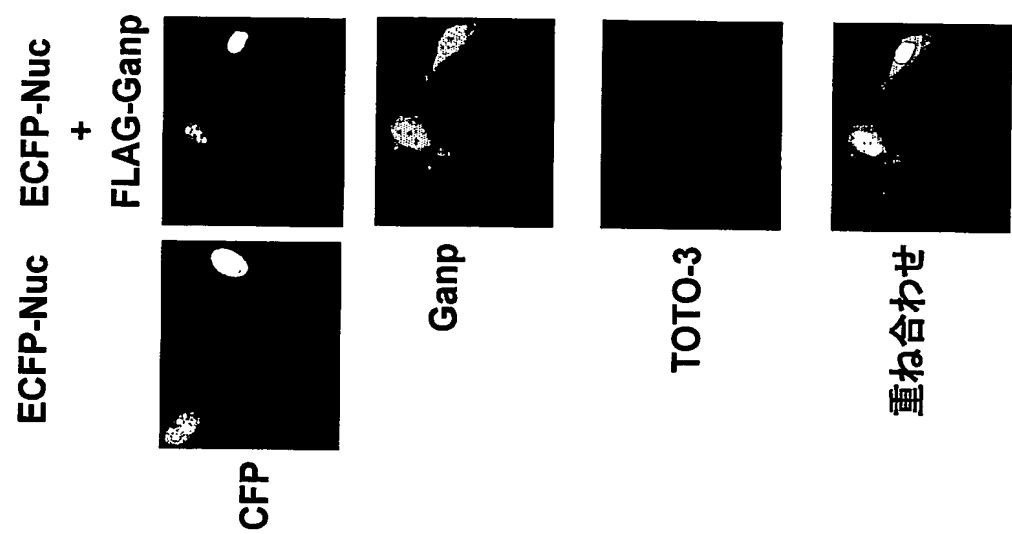


図 4 2

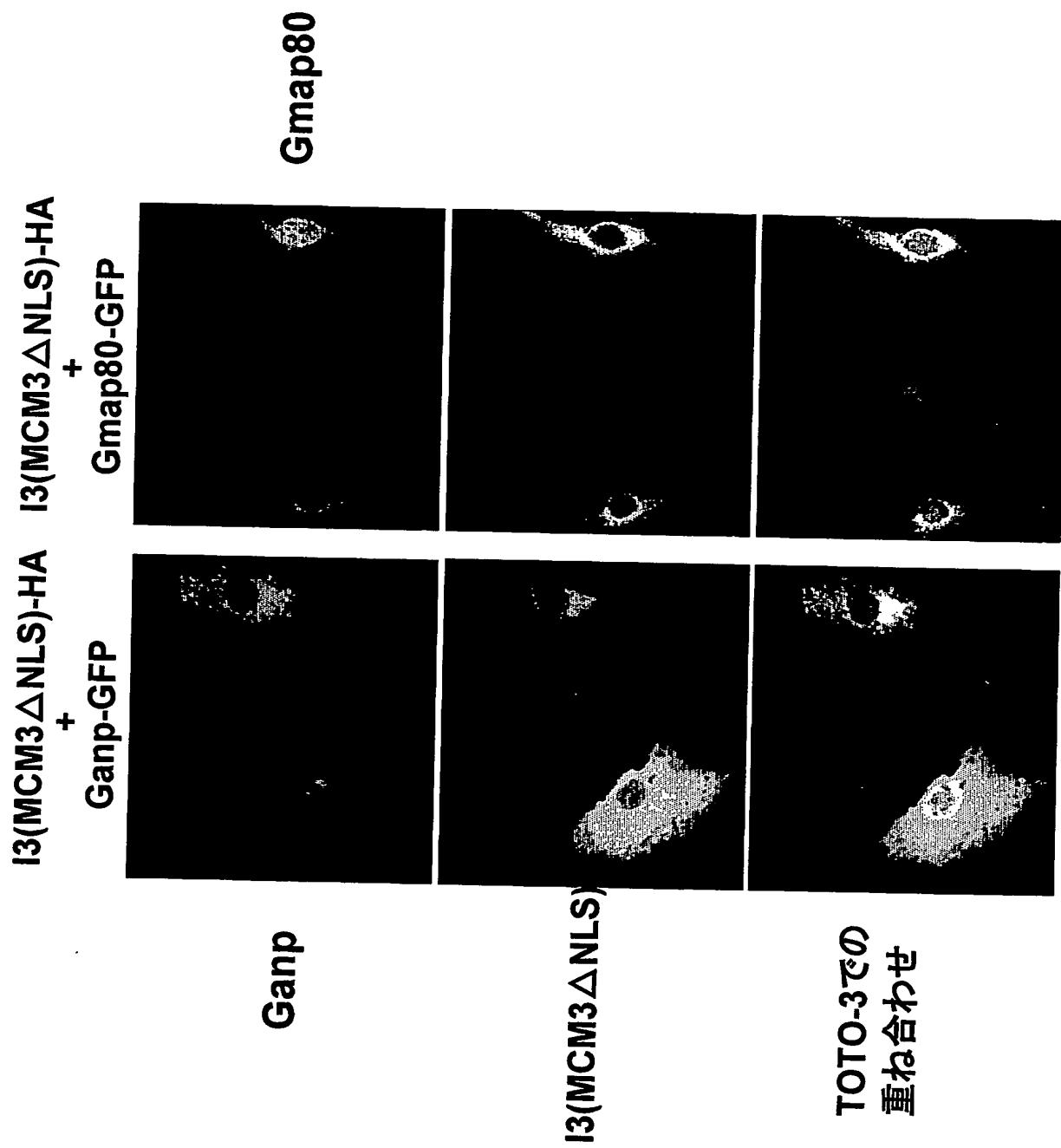
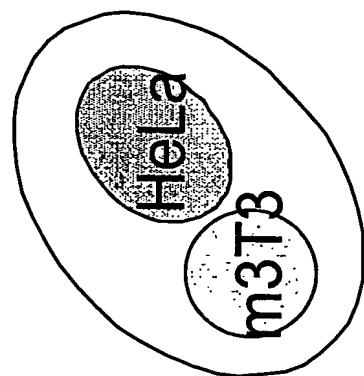
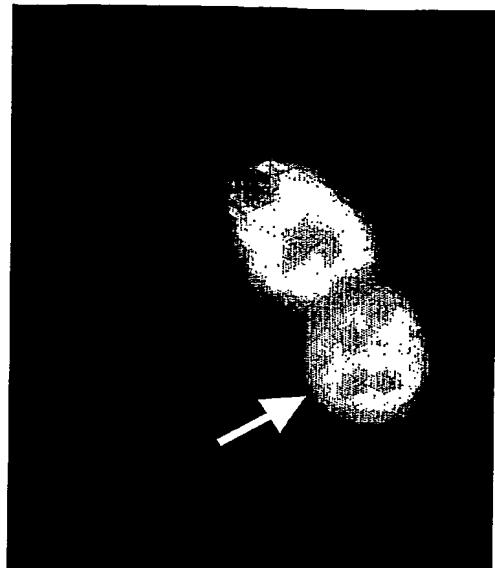
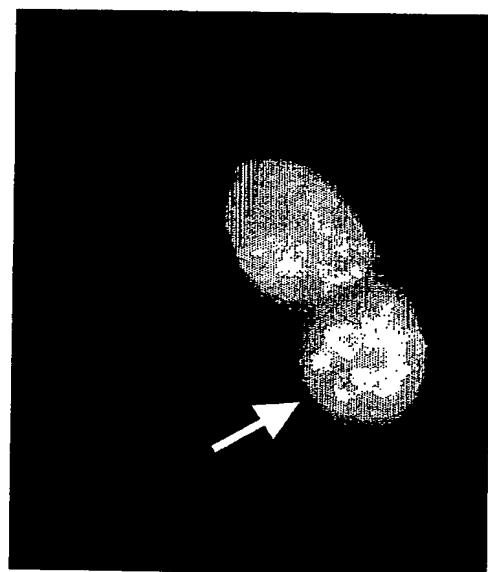


図 4 3

MCM3-HA



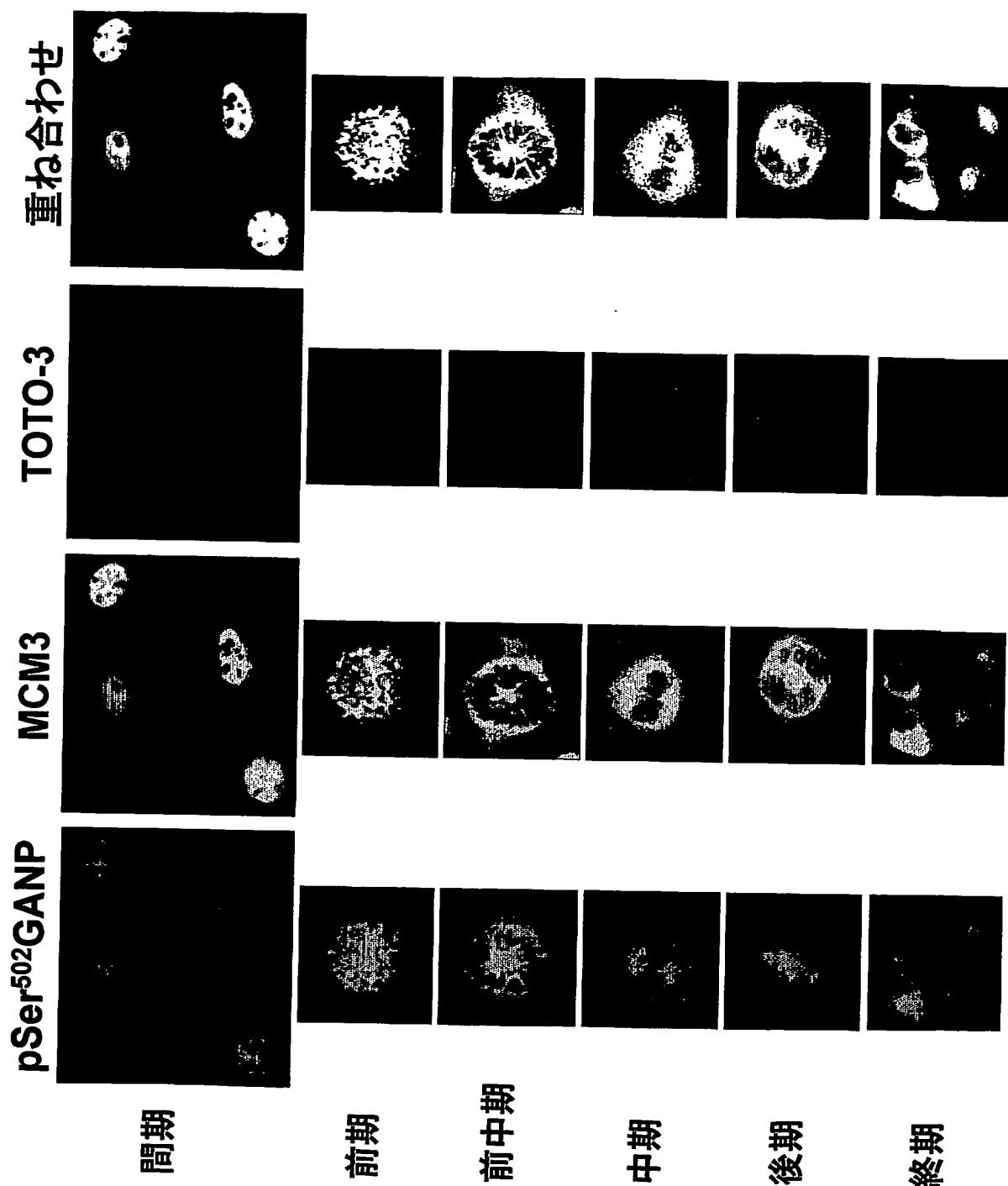
ヘキスト



位相差



図 4 4



SEQUENCE LISTING

<110> Kumamoto Technology & Industry Foundation

<120> A GANP-introduced transgenic mammal and use thereof

<130> P03-0152PCT

<150> PCT/JP02/11598

<151> 2002-11-07

<160> 36

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 6429

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (384)..(6299)

<400> 1

gttgcggtgtc ggtgggccccg gtagaggctg cacgcagact gtgggcgagc acaagcgctg 60

gcgacagtgg ccgtatctgg cggacttgct cctccctccg cggcctccgc tgtcccttgt 120

gtctttgccg agttgtgaa ggccttcact agtcttcgct cgaaggcgtc tgttaaccta 180

gcggccggct tccggagtgt taagcatcgg ggataaaaaag ctattatttc tagaccaggg 240

catcgcaagt tcgagttacc gggagaaaaa tgagatggtc atcctgagga tgaaggagag 300

cttccccctgg caacagataa tttaaaggagg agagctactt gtgtatagtc catatttatt 360
 gccttcagat aattggcttg aag atg cac ccg gtg aac ccc ttc gga ggc agc 413
 Met His Pro Val Asn Pro Phe Gly Gly Ser
 1 . 5 10
 agc cca agt gct ttt gcg gta tct tcc agc acc acg gga aca tat cag 461
 Ser Pro Ser Ala Phe Ala Val Ser Ser Thr Thr Gly Thr Tyr Gln
 15 20 25
 act aaa tca cca ttt cga ttt ggc cag cct tcc ctt ttt gga cag aac 509
 Thr Lys Ser Pro Phe Arg Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn
 30 35 40
 agc aca ccc agc aag agc ctg gcg ttt tca caa gta cca agc ttt gca 557
 Ser Thr Pro Ser Lys Ser Leu Ala Phe Ser Gln Val Pro Ser Phe Ala
 45 50 55
 aca ccc tct gga gga agc cat tct tcc tcc ttg cca gca ttt gga ctc 605
 Thr Pro Ser Gly Gly Ser His Ser Ser Leu Pro Ala Phe Gly Leu
 60 65 70
 acc caa acc tca agt gtg gga ctc ttc tct agt ctc gaa tcc aca cct 653
 Thr Gln Thr Ser Ser Val Gly Leu Phe Ser Ser Leu Glu Ser Thr Pro
 75 80 85 90
 tct ttc gca gct act tcg agt tcc tct gtg ccc ggc aat acg gca ttc 701
 Ser Phe Ala Ala Thr Ser Ser Ser Val Pro Gly Asn Thr Ala Phe
 95 100 105
 agc ttt aag tca acc tct agc gtt ggg gtt ttc cca agt ggc gct act 749
 Ser Phe Lys Ser Thr Ser Ser Val Gly Val Phe Pro Ser Gly Ala Thr
 110 115 120
 ttt ggg cca gaa acc gga gaa gta gca ggt tct ggc ttt cggt aag acg 797
 Phe Gly Pro Glu Thr Gly Glu Val Ala Gly Ser Gly Phe Arg Lys Thr

125	130	135	
gaa ttc aag ttt aaa cct ctg gaa aat gca gtc ttc aaa ccg ata ccg Glu Phe Lys Phe Lys Pro Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Pro			845
140	145	150	
ggg cct gag tca gag cca gaa aaa acc cag agc cag att tct tct gga Gly Pro Glu Ser Glu Pro Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ser Ser Gly			893
155	160	165	170
ttt ttt aca ttt tcc cat ccc gtt ggt agc ggg tct gga ggc ctg acc Phe Phe Thr Phe Ser His Pro Val Gly Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr			941
175	180	185	
cct ttt tct ttc cca cag gtg aca aat agt tcg gtg act agc tca agt Pro Phe Ser Phe Pro Gln Val Thr Asn Ser Ser Val Thr Ser Ser Ser			989
190	195	200	
ttt atc ttt tcg aaa cca gtt act agt aat act cct gcc ttt gcc tct Phe Ile Phe Ser Lys Pro Val Thr Ser Asn Thr Pro Ala Phe Ala Ser			1037
205	210	215	
cct ttg tct aac caa aat gta gaa gaa gag aag agg gtt tct acg tca Pro Leu Ser Asn Gln Asn Val Glu Glu Glu Lys Arg Val Ser Thr Ser			1085
220	225	230	
gcg ttt gga agc tca aac agt agc ttc agt act ttc ccc aca gcg tca Ala Phe Gly Ser Ser Asn Ser Ser Phe Ser Thr Phe Pro Thr Ala Ser			1133
235	240	245	250
cca gga tct ttg ggg gag ccc ttc cca gct aac aaa cca agc ctc cgc Pro Gly Ser Leu Gly Glu Pro Phe Pro Ala Asn Lys Pro Ser Leu Arg			1181
255	260	265	
caa gga tgt gag gaa gcc atc tcc cag gtg gag cca ctt ccc acc ctc Gln Gly Cys Glu Glu Ala Ile Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Thr Leu			1229

atg aag gga tta aag agg aaa gag gac cag gat cgc tcc ccg agg aga Met Lys Gly Leu Lys Arg Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg	285	290	295	1277
cat tgc cac gag gca gca gaa gac cct gat ccc ctg tcc agg ggc gac His Cys His Glu Ala Ala Glu Asp Pro Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp	300	305	310	1325
cat ccc cca gat aaa cggtt cca gtc cgc ctc aac aga ccc cggtt gga ggt His Pro Pro Asp Lys Arg Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly	315	320	325	1373
act ttg ttt ggc cggtt aca ata cag gag gtc ttc aaa agc aat aaa gag Thr Leu Phe Gly Arg Thr Ile Gln Glu Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu	335	340	345	1421
gca ggc cgc ctg ggc agc aag gaa tcc aag gag agt ggc ttt gcg gaa Ala Gly Arg Leu Gly Ser Lys Glu Ser Lys Glu Ser Gly Phe Ala Glu	350	355	360	1469
cct ggg gaa agt gac cac gac gtc cca gga ggg agt cag tcc acc Pro Gly Glu Ser Asp His Ala Ala Val Pro Gly Gly Ser Gln Ser Thr	365	370	375	1517
atg gta cct tcc cgc ctt cca gct gtg act aaa gag gaa gaa gaa agt Met Val Pro Ser Arg Leu Pro Ala Val Thr Lys Glu Glu Glu Glu Ser	380	385	390	1565
aga gat gag aaa gaa gat tct ctc agg gga aag tct gtg cgc cag agt Arg Asp Glu Lys Glu Asp Ser Leu Arg Gly Lys Ser Val Arg Gln Ser	395	400	405	1613
aag cga agg gaa gag tgg atc tac agc ctc ggg ggc gtg tct tct tta Lys Arg Arg Glu Glu Trp Ile Tyr Ser Leu Gly Gly Val Ser Ser Leu				1661

415

420

425

gag ctc aca gcc atc cag tgc aag aac atc ccc gac tac ctc aac gac 1709
 Glu Leu Thr Ala Ile Gln Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp

430

435

440

aga gcc atc ctg gag aaa cac ttc agc aaa atc gct aaa gtc cag cgg 1757
 Arg Ala Ile Leu Glu Lys His Phe Ser Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg
 445 450 455

gtc ttc acc aga cgc agc aag aag ctc gcc gtg att cat ttt ttc gac 1805
 Val Phe Thr Arg Arg Ser Lys Lys Leu Ala Val Ile His Phe Phe Asp
 460 465 470

cac gca tcg gca gcc ctg gct agg aag aag ggg aaa ggt ctg cat aag 1853
 His Ala Ser Ala Ala Leu Ala Arg Lys Lys Gly Lys Gly Leu His Lys
 475 480 485 490

gac gtg gtt atc ttt tgg cac aag aag aaa ata agt ccc agc aag aaa 1901
 Asp Val Val Ile Phe Trp His Lys Lys Lys Ile Ser Pro Ser Lys Lys
 495 500 505

ctc ttt ccc ctg aag gag aag ctt ggt gag agt gaa gcc agc cag ggc 1949
 Leu Phe Pro Leu Lys Glu Lys Leu Gly Glu Ser Glu Ala Ser Gln Gly
 510 515 520

atc gag gac tcc ccc ttt cag cac tcg cct ctc agc aag ccc atc gtg 1997
 Ile Glu Asp Ser Pro Phe Gln His Ser Pro Leu Ser Lys Pro Ile Val
 525 530 535

agg cct gca gcc ggc agc ctc ctc agc aaa agc tct cca gtg aag aag 2045
 Arg Pro Ala Ala Gly Ser Leu Leu Ser Lys Ser Pro Val Lys Lys
 540 545 550

ccg agt ctt ctg aag atg cac cag ttt gag gcg gat cct ttt gac tct 2093
 Pro Ser Leu Leu Lys Met His Gln Phe Glu Ala Asp Pro Phe Asp Ser

555	560	565	570													
				2141												
Gly	Ser	Glu	Gly	Ser	Glu	Gly	Leu	Gly	Ser	Cys	Val	Ser	Ser	Leu	Ser	
575					580									585		
acc ctg ata ggg act gtg gca gac aca tct gag gag aag tac cgc ctt																2189
Thr	Leu	Ile	Gly	Thr	Val	Ala	Asp	Thr	Ser	Glu	Glu	Lys	Tyr	Arg	Leu	
590					595									600		
ctg gac cag aga gac cgc atc atg cgg caa gct cga gtg aag agg acg																2237
Leu	Asp	Gln	Arg	Asp	Arg	Ile	Met	Arg	Gln	Ala	Arg	Val	Lys	Arg	Thr	
605					610									615		
gac ctg gac aaa gcc agg gca ttt gtt ggg act tgc cct gac atg tgt																2285
Asp	Leu	Asp	Lys	Ala	Arg	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Cys	Pro	Asp	Met	Cys	
620					625									630		
ccc gag aag gag cgg tac ttg agg gag acc cgg agc cag ctg agc gtg																2333
Pro	Glu	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Arg	Glu	Thr	Arg	Ser	Gln	Leu	Ser	Val	
635					640					645				650		
ttt gaa gtt gtc cca ggg act gac cag gtg gac cat gca gca gcc gtg																2381
Phe	Glu	Val	Val	Pro	Gly	Thr	Asp	Gln	Val	Asp	His	Ala	Ala	Ala	Val	
655					660					665						
aag gag tac agc cgg tcc tct gca gat cag gag gag ccc ctg cca cat																2429
Lys	Glu	Tyr	Ser	Arg	Ser	Ser	Ala	Asp	Gln	Glu	Glu	Pro	Leu	Pro	His	
670					675					680						
gag ctg aga ccc tca gca gtt ctc agc agg acc atg gac tac ctg gtg																2477
Glu	Leu	Arg	Pro	Ser	Ala	Val	Leu	Ser	Arg	Thr	Met	Asp	Tyr	Leu	Val	
685					690					695						
acc cag atc atg gac caa aag gaa ggc agc ctt cgg gat tgg tat gac																2525
Thr	Gln	Ile	Met	Asp	Gln	Lys	Glu	Gly	Ser	Leu	Arg	Asp	Trp	Tyr	Asp	

700	705	710	
ttc gtg tgg aac cgc acc cgg ggt ata cgg aag gac ata aca cag cag Phe Val Trp Asn Arg Thr Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln Gln			2573
715	720	725	730
 cac ctc tgt gat ccc ctg acg gtg tct ctg atc gag aag tgt acc cga His Leu Cys Asp Pro Leu Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr Arg			2621
735	740	745	
 ttt cac att cac tgt gcc cac ttt atg tgt gag gag cct atg tct tcc Phe His Ile His Cys Ala His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser Ser			2669
750	755	760	
 ttt gat gcc aag atc aac aat gag aac atg acc aag tgt cta cag agt Phe Asp Ala Lys Ile Asn Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln Ser			2717
765	770	775	
 ctg aag gag atg tac cag gac ctg agg aac aag ggt gtt ttt tgt gcc Leu Lys Glu Met Tyr Gln Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys Ala			2765
780	785	790	
 agt gaa gca gag ttt cag ggc tac aat gtc ctg ctt aat ctc aac aaa Ser Glu Ala Glu Phe Gln Gly Tyr Asn Val Leu Leu Asn Leu Asn Lys			2813
795	800	805	810
 gga gac att ttg aga gaa gtg cag cag ttc cac cct gac gtt agg aac Gly Asp Ile Leu Arg Glu Val Gln Gln Phe His Pro Asp Val Arg Asn			2861
815	820	825	
 tcc cca gag gtg aac ttc gct gtc cag gct ttt gct gca ttg aac agc Ser Pro Glu Val Asn Phe Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn Ser			2909
830	835	840	
 aat aat ttt gtg aga ttt ttc aaa ctg gtt cag tca gct tct tac ctg Asn Asn Phe Val Arg Phe Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr Leu			2957

845

850

855

aat gcg tgc ctg tta cac tgt tac ttt aat cag atc cgc aag gat gcc 3005
 Asn Ala Cys Leu Leu His Cys Tyr Phe Asn Gln Ile Arg Lys Asp Ala
 860 865 870

ctc cgg gca ctc aat gtt gct tat act gta agc aca cag cgc tct acc 3053
 Leu Arg Ala Leu Asn Val Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser Thr
 875 880 885 890

gtc ttc ccc ctg gat ggt gtc gtc cgc atg ctg ctg ttc aga gat agt 3101
 Val Phe Pro Leu Asp Gly Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp Ser
 895 900 905

gaa gag gcg aca aac ttc ctc aat tac cat ggc ctc act gta gct gat 3149
 Glu Glu Ala Thr Asn Phe Leu Asn Tyr His Gly Leu Thr Val Ala Asp
 910 915 920

ggc tgt gtt gag ctg aat cgg tcg gca ttc ttg gaa ccg gag gga tta 3197
 Gly Cys Val Glu Leu Asn Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly Leu
 925 930 935

tgc aag gcc agg aag tca gtg ttt att ggc cgg aag ctg acg gtg tca 3245
 Cys Lys Ala Arg Lys Ser Val Phe Ile Gly Arg Lys Leu Thr Val Ser
 940 945 950

gtt ggg gaa gtt gtg aat gga ggg ccg ttg ccc cct gtt cct cgc cat 3293
 Val Gly Glu Val Val Asn Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg His
 955 960 965 970

aca cct gtg tgc agc ttc aac tcc cag aat aag tac gtt gga gag agc 3341
 Thr Pro Val Cys Ser Phe Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Val Gly Glu Ser
 975 980 985

ctg gct acg gag ctg ccc atc agc act cag aga gct ggt gga gac cca 3389
 Leu Ala Thr Glu Leu Pro Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gly Gly Asp Pro

990

995

1000

gca ggt ggt ggc aga gga gag gac tgt gag gca gag gtg gac ttg 3434
 Ala Gly Gly Gly Arg Gly Glu Asp Cys Glu Ala Glu Val Asp Leu
 1005 1010 1015

cca aca ttg gcg gtc ctc cca cag ccg cct cct gca tcc tca gcc 3479
 Pro Thr Leu Ala Val Leu Pro Gln Pro Pro Pro Ala Ser Ser Ala
 1020 1025 1030

acg ccg gcg ctt cat gtc cag cca ctg gcc cca gcc gca gca ccc 3524
 Thr Pro Ala Leu His Val Gln Pro Leu Ala Pro Ala Ala Ala Pro
 1035 1040 1045

agc ctt ctc cag gcc tcc acg cag cct gag gtg ctg ctt cca aag 3569
 Ser Leu Leu Gln Ala Ser Thr Gln Pro Glu Val Leu Leu Pro Lys
 1050 1055 1060

cct gcg cct gtg tac tct gac tcg gac ctg gta cag gtg gtg gac 3614
 Pro Ala Pro Val Tyr Ser Asp Ser Asp Leu Val Gln Val Val Asp
 1065 1070 1075

gag ctc atc cag gag gct ctg caa gtg gac tgt gag gaa gtc agc 3659
 Glu Leu Ile Gln Glu Ala Leu Gln Val Asp Cys Glu Glu Val Ser
 1080 1085 1090

tcc gct ggg gca gcc tac gta gcc gca gct ctg ggc gtt tcc aat 3704
 Ser Ala Gly Ala Ala Tyr Val Ala Ala Ala Leu Gly Val Ser Asn
 1095 1100 1105

gct gct gtg gag gat ctg att act gct gcg acc acg ggc att ctg 3749
 Ala Ala Val Glu Asp Leu Ile Thr Ala Ala Thr Thr Gly Ile Leu
 1110 1115 1120

agg cac gtt gcc gct gag gaa gtt tcc atg gaa agg cag aga cta 3794
 Arg His Val Ala Ala Glu Glu Val Ser Met Glu Arg Gln Arg Leu

1125

1130

1135

gag gaa gag aag caa cga gct gag gag gaa cg^g ttg aag caa gag 3839
 Glu Glu Glu Lys Gln Arg Ala Glu Glu Glu Arg Leu Lys Gln Glu
 1140 1145 1150

aga gaa ctg atg tta act cag ctg agc gag ggt ctg gcc gca gag 3884
 Arg Glu Leu Met Leu Thr Gln Leu Ser Glu Gly Leu Ala Ala Glu
 1155 1160 1165

ctg aca gaa ctc acg gtg aca gag tgt gtg tgg gaa acc tgc tct 3929
 Leu Thr Glu Leu Thr Val Thr Glu Cys Val Trp Glu Thr Cys Ser
 1170 1175 1180

cag gag cta cag agt gca gta aaa ata gac cag aag gtc cgt gtg 3974
 Gln Glu Leu Gln Ser Ala Val Lys Ile Asp Gln Lys Val Arg Val
 1185 1190 1195

gcc cgc tgt tgt gaa gcc gtc tgt gca cac ctg gtg gat ttg ttt 4019
 Ala Arg Cys Cys Glu Ala Val Cys Ala His Leu Val Asp Leu Phe
 1200 1205 1210

ctt gct gag gaa att ttc cag act gca aaa gag aca ctc cag gaa 4064
 Leu Ala Glu Glu Ile Phe Gln Thr Ala Lys Glu Thr Leu Gln Glu
 1215 1220 1225

ctc cag tgt ttc tgc aag tat cta caa cgg tgg agg gag gct gtt 4109
 Leu Gln Cys Phe Cys Lys Tyr Leu Gln Arg Trp Arg Glu Ala Val
 1230 1235 1240

gca gct cgg aag aaa ttc cgg cgt cag atg cgg gcc ttc cct gca 4154
 Ala Ala Arg Lys Lys Phe Arg Arg Gln Met Arg Ala Phe Pro Ala
 1245 1250 1255

gcg cca tgc tgt gtg gat gtg aat gac cgg ctg cag gca cta gtg 4199
 Ala Pro Cys Cys Val Asp Val Asn Asp Arg Leu Gln Ala Leu Val

1260	1265	1270	
ccc agc gca gag tgc ccc att act gag gag aac ctg gcc aag ggt 4244 Pro Ser Ala Glu Cys Pro Ile Thr Glu Glu Asn Leu Ala Lys Gly 1275 1280 1285			
ctt ttg gac ctg ggc cac gca ggc aaa gta ggc gtc tcc tgt acc 4289 Leu Leu Asp Leu Gly His Ala Gly Lys Val Gly Val Ser Cys Thr 1290 1295 1300			
agg ttg agg cgg ctt aga aac aag aca gct cac cag ata aag gtc 4334 Arg Leu Arg Arg Leu Arg Asn Lys Thr Ala His Gln Ile Lys Val 1305 1310 1315			
cag cac ttc cac cag cag ctg ctg agg aat gct gca tgg gca cct 4379 Gln His Phe His Gln Gln Leu Leu Arg Asn Ala Ala Trp Ala Pro 1320 1325 1330			
ctg gac ctg cca tcc att gtg tct gag cac ctc ccc atg aag cag 4424 Leu Asp Leu Pro Ser Ile Val Ser Glu His Leu Pro Met Lys Gln 1335 1340 1345			
aag cga agg ttt tgg aaa ctg gtg ctg gtg ttg cct gat gtg gaa 4469 Lys Arg Arg Phe Trp Lys Leu Val Leu Val Leu Pro Asp Val Glu 1350 1355 1360			
gag cag act cca gag agt cct ggc aga ata cta gaa aac tgg cta 4514 Glu Gln Thr Pro Glu Ser Pro Gly Arg Ile Leu Glu Asn Trp Leu 1365 1370 1375			
aag gtc aaa ttc aca gga gat gac agc atg gtg ggt gac ata gga 4559 Lys Val Lys Phe Thr Gly Asp Asp Ser Met Val Gly Asp Ile Gly 1380 1385 1390			
gat aat gct ggt gat atc cag acc ctc tca gtc ttt aat aca ctt 4604 Asp Asn Ala Gly Asp Ile Gln Thr Leu Ser Val Phe Asn Thr Leu			

1395

1400

1405

agt agt aaa ggg gat caa aca gtt tct gtc aac gtg tgt ata aag 4649
 Ser Ser Lys Gly Asp Gln Thr Val Ser Val Asn Val Cys Ile Lys
 1410 1415 1420

gtg gct cat ggc acc ctt agt gac agt gcc ctt gat gct gtg gag 4694
 Val Ala His Gly Thr Leu Ser Asp Ser Ala Leu Asp Ala Val Glu
 1425 1430 1435

acc cag aag gac ctg ttg gga acc agt ggg ctc atg ctg ctg ctt 4739
 Thr Gln Lys Asp Leu Leu Gly Thr Ser Gly Leu Met Leu Leu Leu
 1440 1445 1450

ccc ccg aaa gtg aag agt gag gag gtg gca gag gag gaa ctg tcc 4784
 Pro Pro Lys Val Lys Ser Glu Glu Val Ala Glu Glu Glu Leu Ser
 1455 1460 1465

tgg ctg tcg gct tta ctg cag ctc aag cag ctt ctg cag gcc aag 4829
 Trp Leu Ser Ala Leu Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln Ala Lys
 1470 1475 1480

ccc ttc cag cct gcc ctg ccg ctg gtg gtc ctc gtg ccc agc tcc 4874
 Pro Phe Gln Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Val Pro Ser Ser
 1485 1490 1495

aga ggg gac tcc gcg ggg agg gca gta gag gac ggt ctg atg tta 4919
 Arg Gly Asp Ser Ala Gly Arg Ala Val Glu Asp Gly Leu Met Leu
 1500 1505 1510

cag gat ttg gtt tca gcc aag ctg att tcc gat tac att gtt gtt 4964
 Gln Asp Leu Val Ser Ala Lys Leu Ile Ser Asp Tyr Ile Val Val
 1515 1520 1525

gag att cct gac tct gtt aat gat tta caa ggc aca gtg aag gtt 5009
 Glu Ile Pro Asp Ser Val Asn Asp Leu Gln Gly Thr Val Lys Val

1530	1535	1540	
tct gga gca gtc cag tgg ctg atc tcc gga tgt cct caa gcc cta 5054 Ser Gly Ala Val Gln Trp Leu Ile Ser Gly Cys Pro Gln Ala Leu			
1545	1550	1555	
gac ctt tgc tgc cag acc ctt gtt cag tat gtt gag gat ggg atc 5099 Asp Leu Cys Cys Gln Thr Leu Val Gln Tyr Val Glu Asp Gly Ile			
1560	1565	1570	
agc cgc gag ttc agc cgt cgg ttt ttc cac gac agg aga gag agg 5144 Ser Arg Glu Phe Ser Arg Arg Phe Phe His Asp Arg Arg Glu Arg			
1575	1580	1585	
cgc ctg gct agc ctg ccc tcc cag gag cct agc acc att att gag 5189 Arg Leu Ala Ser Leu Pro Ser Gln Glu Pro Ser Thr Ile Ile Glu			
1590	1595	1600	
ttg ttc aac agt gtg ctg cag ttc ctg gcc tct gtg gta tcc tct 5234 Leu Phe Asn Ser Val Leu Gln Phe Leu Ala Ser Val Val Ser Ser			
1605	1610	1615	
gag cag ctg tgt gac atc tcc tgg cct gtc atg gaa ttt gcc gaa 5279 Glu Gln Leu Cys Asp Ile Ser Trp Pro Val Met Glu Phe Ala Glu			
1620	1625	1630	
gtg gga ggc agc cag ctg ctt cct cac ctg cac tgg aac tca cca 5324 Val Gly Gly Ser Gln Leu Leu Pro His Leu His Trp Asn Ser Pro			
1635	1640	1645	
gag cat cta gcg tgg ctg aaa caa gct gtg ctt ggg ttc cag ctt 5369 Glu His Leu Ala Trp Leu Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe Gln Leu			
1650	1655	1660	
cca cag atg gac ctt cca ccc cca ggg gcc ccc tgg ctc cct gtg 5414 Pro Gln Met Asp Leu Pro Pro Pro Gly Ala Pro Trp Leu Pro Val			

1665	1670	1675	
tgt tcc atg gtc att cag tac acc	tcc cag att ccc agc tca agc		5459
Cys Ser Met Val Ile Gln Tyr Thr	Ser Gln Ile Pro Ser Ser		
1680	1685	1690	
cag aca cag cct gtc ctc cag tcc	cag gcg gag aac ctg ctg tgc		5504
Gln Thr Gln Pro Val Leu Gln Ser	Gln Ala Glu Asn Leu Leu Cys		
1695	1700	1705	
aga aca tac cag aag tgg aag aac	aag agc ctc tct cca ggc cag		5549
Arg Thr Tyr Gln Lys Trp Lys Asn	Lys Ser Leu Ser Pro Gly Gln		
1710	1715	1720	
gag ttg ggg cct tct gtt gcc gag	atc ccg tgg gat gac atc atc		5594
Glu Leu Gly Pro Ser Val Ala Glu	Ile Pro Trp Asp Asp Ile Ile		
1725	1730	1735	
acc tta tgc atc aat cat aag ctg	agg gac tgg aca ccc ccc agg		5639
Thr Leu Cys Ile Asn His Lys Leu	Arg Asp Trp Thr Pro Pro Arg		
1740	1745	1750	
ctc cct gtc aca tta gag gcg ctg	agt gaa gat ggt caa ata tgt		5684
Leu Pro Val Thr Leu Glu Ala Leu	Ser Glu Asp Gly Gln Ile Cys		
1755	1760	1765	
gtg tat ttt ttc aaa aac ctt tta	aga aaa tac cac gtt ccc tcg		5729
Val Tyr Phe Phe Lys Asn Leu Leu	Arg Lys Tyr His Val Pro Ser		
1770	1775	1780	
tca tgg gaa cag gcc aga atg cag	acg cag cg gaa ctg cag ctg		5774
Ser Trp Glu Gln Ala Arg Met Gln	Thr Gln Arg Glu Leu Gln Leu		
1785	1790	1795	
agt cat gga cgt tcg ggg atg agg	tcc atc cat cct cct aca agc		5819
Ser His Gly Arg Ser Gly Met Arg	Ser Ile His Pro Pro Thr Ser		

1800	1805	1810		
act ttt cct	act cca ttg ctt cat	gta cac cag aaa ggg	aag aaa	5864
Thr Phe Pro	Thr Pro Leu Leu His	Val His Gln Lys Gly	Lys Lys	
1815	1820	1825		
aag gaa gag	agt ggc cga gag ggg	agc ctc agt aca gag	gac ctc	5909
Lys Glu Glu	Ser Gly Arg Glu Gly	Ser Leu Ser Thr Glu	Asp Leu	
1830	1835	1840		
ctg cgg ggg	gct tct gca gaa gag	ctc ctg gca cag agt	ctg tcc	5954
Leu Arg Gly	Ala Ser Ala Glu Glu	Leu Leu Ala Gln Ser	Leu Ser	
1845	1850	1855		
agc agt ctt	ctg gaa gag aag gaa	gag aac aag agg ttt	gaa gat	5999
Ser Ser Leu	Leu Glu Glu Lys Glu	Glu Asn Lys Arg Phe	Glu Asp	
1860	1865	1870		
caa ctt cag	cag tgg tta tcg caa	gac tca cag gca ttc	aca gag	6044
Gln Leu Gln	Gln Trp Leu Ser Gln	Asp Ser Gln Ala Phe	Thr Glu	
1875	1880	1885		
tca act cgg	ctt cct ctc tac ctc	cct cag acg cta gtg	tcc ttt	6089
Ser Thr Arg	Leu Pro Leu Tyr Leu	Pro Gln Thr Leu Val	Ser Phe	
1890	1895	1900		
cct gat tct	atc aaa act cag acc	atg gtg aaa aca tct	aca agt	6134
Pro Asp Ser	Ile Lys Thr Gln Thr	Met Val Lys Thr Ser	Thr Ser	
1905	1910	1915		
cct cag aat	tca gga aca gga aag	cag ttg agg ttc tca	gag gca	6179
Pro Gln Asn	Ser Gly Thr Gly Lys	Gln Leu Arg Phe Ser	Glu Ala	
1920	1925	1930		
tcc ggt tca	tcc ctg acg gaa aag	ctg aag ctc ctg gaa	agg ctg	6224
Ser Gly Ser	Ser Leu Thr Glu Lys	Leu Lys Leu Leu Glu	Arg Leu	

1935

1940

1945

atc cag agc tca agg gcg gaa gaa gca gcc tcc gag ctg cac ctc 6269
 Ile Gln Ser Ser Arg Ala Glu Glu Ala Ala Ser Glu Leu His Leu
 1950 1955 1960

tct gca ctg ctg gag atg gtg gac atg tag ctgtctgacg ggagacggat 6319
 Ser Ala Leu Leu Glu Met Val Asp Met
 1965 1970

ctctaattca taatgc ttg tctgtattca attgtgttat agatgctgtt ggaaatgtga 6379

ctattaatta tgcaaataaa cttttgaat cattccaaaa aaaaaaccat 6429

<210> 2

<211> 1971

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met His Pro Val Asn Pro Phe Gly Gly Ser Ser Pro Ser Ala Phe Ala
 1 5 10 15

Val Ser Ser Ser Thr Thr Gly Thr Tyr Gln Thr Lys Ser Pro Phe Arg
 20 25 30

Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn Ser Thr Pro Ser Lys Ser
 35 40 45

Leu Ala Phe Ser Gln Val Pro Ser Phe Ala Thr Pro Ser Gly Gly Ser
 50 55 60

His Ser Ser Ser Leu Pro Ala Phe Gly Leu Thr Gln Thr Ser Ser Val
65 70 75 80

Gly Leu Phe Ser Ser Leu Glu Ser Thr Pro Ser Phe Ala Ala Thr Ser
85 90 95

Ser Ser Ser Val Pro Gly Asn Thr Ala Phe Ser Phe Lys Ser Thr Ser
100 105 110

Ser Val Gly Val Phe Pro Ser Gly Ala Thr Phe Gly Pro Glu Thr Gly
115 120 125

Glu Val Ala Gly Ser Gly Phe Arg Lys Thr Glu Phe Lys Phe Lys Pro
130 135 140

Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Pro Gly Pro Glu Ser Glu Pro
145 150 155 160

Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ser Ser Gly Phe Phe Thr Phe Ser His
165 170 175

Pro Val Gly Ser Gly Ser Gly Leu Thr Pro Phe Ser Phe Pro Gln
180 185 190

Val Thr Asn Ser Ser Val Thr Ser Ser Ser Phe Ile Phe Ser Lys Pro
195 200 205

Val Thr Ser Asn Thr Pro Ala Phe Ala Ser Pro Leu Ser Asn Gln Asn
210 215 220

Val Glu Glu Glu Lys Arg Val Ser Thr Ser Ala Phe Gly Ser Ser Asn
225 230 235 240

Ser Ser Phe Ser Thr Phe Pro Thr Ala Ser Pro Gly Ser Leu Gly Glu
245 250 255

Pro Phe Pro Ala Asn Lys Pro Ser Leu Arg Gln Gly Cys Glu Glu Ala
260 265 270

Ile Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Thr Leu Met Lys Gly Leu Lys Arg
275 280 285

Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg His Cys His Glu Ala Ala
290 295 300

Glu Asp Pro Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp His Pro Pro Asp Lys Arg
305 310 315 320

Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly Thr Leu Phe Gly Arg Thr
325 330 335

Ile Gln Glu Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu Ala Gly Arg Leu Gly Ser
340 345 350

Lys Glu Ser Lys Glu Ser Gly Phe Ala Glu Pro Gly Glu Ser Asp His
355 360 365

Ala Ala Val Pro Gly Gly Ser Gln Ser Thr Met Val Pro Ser Arg Leu
370 375 380

Pro Ala Val Thr Lys Glu Glu Glu Ser Arg Asp Glu Lys Glu Asp
385 390 395 400

Ser Leu Arg Gly Lys Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Arg Glu Glu Trp
405 410 415

Ile Tyr Ser Leu Gly Gly Val Ser Ser Leu Glu Leu Thr Ala Ile Gln
420 425 430

Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp Arg Ala Ile Leu Glu Lys
435 440 445

His Phe Ser Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg Val Phe Thr Arg Arg Ser
450 455 460

Lys Lys Leu Ala Val Ile His Phe Phe Asp His Ala Ser Ala Ala Leu
465 470 475 480

Ala Arg Lys Lys Gly Lys Gly Leu His Lys Asp Val Val Ile Phe Trp
485 490 495

His Lys Lys Lys Ile Ser Pro Ser Lys Lys Leu Phe Pro Leu Lys Glu
500 505 510

Lys Leu Gly Glu Ser Glu Ala Ser Gln Gly Ile Glu Asp Ser Pro Phe
515 520 525

Gln His Ser Pro Leu Ser Lys Pro Ile Val Arg Pro Ala Ala Gly Ser
530 535 540

Leu Leu Ser Lys Ser Ser Pro Val Lys Lys Pro Ser Leu Leu Lys Met
545 550 555 560

His Gln Phe Glu Ala Asp Pro Phe Asp Ser Gly Ser Glu Gly Ser Glu
565 570 575

Gly Leu Gly Ser Cys Val Ser Ser Leu Ser Thr Leu Ile Gly Thr Val
580 585 590

Ala Asp Thr Ser Glu Glu Lys Tyr Arg Leu Leu Asp Gln Arg Asp Arg
595 600 605

Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg Thr Asp Leu Asp Lys Ala Arg
610 615 620

Ala Phe Val Gly Thr Cys Pro Asp Met Cys Pro Glu Lys Glu Arg Tyr
625 630 635 640

Leu Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser Val Phe Glu Val Val Pro Gly
645 650 655

Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Val Lys Glu Tyr Ser Arg Ser
660 665 670

Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro His Glu Leu Arg Pro Ser Ala
675 680 685

Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu Val Thr Gln Ile Met Asp Gln
690 695 700

Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr Asp Phe Val Trp Asn Arg Thr
705 710 715 720

Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln Gln His Leu Cys Asp Pro Leu
725 730 735

Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr Arg Phe His Ile His Cys Ala
740 745 750

His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser Ser Phe Asp Ala Lys Ile Asn
755 760 765

Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln Ser Leu Lys Glu Met Tyr Gln
770 775 780

Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys Ala Ser Glu Ala Glu Phe Gln
785 790 795 800

Gly Tyr Asn Val Leu Leu Asn Leu Asn Lys Gly Asp Ile Leu Arg Glu
805 810 815

Val Gln Gln Phe His Pro Asp Val Arg Asn Ser Pro Glu Val Asn Phe
820 825 830

Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn Ser Asn Asn Phe Val Arg Phe
835 840 845

Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr Leu Asn Ala Cys Leu Leu His
850 855 860

Cys Tyr Phe Asn Gln Ile Arg Lys Asp Ala Leu Arg Ala Leu Asn Val
865 870 875 880

Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser Thr Val Phe Pro Leu Asp Gly
885 890 895

Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp Ser Glu Glu Ala Thr Asn Phe
900 905 910

Leu Asn Tyr His Gly Leu Thr Val Ala Asp Gly Cys Val Glu Leu Asn
915 920 925

Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly Leu Cys Lys Ala Arg Lys Ser
930 935 940

Val Phe Ile Gly Arg Lys Leu Thr Val Ser Val Gly Glu Val Val Asn
945 950 955 960

Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg His Thr Pro Val Cys Ser Phe
965 970 975

Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Val Gly Glu Ser Leu Ala Thr Glu Leu Pro
980 985 990

Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gly Gly Asp Pro Ala Gly Gly Gly Arg Gly
995 1000 1005

Glu Asp Cys Glu Ala Glu Val Asp Leu Pro Thr Leu Ala Val Leu
1010 1015 1020

Pro Gln Pro Pro Pro Ala Ser Ser Ala Thr Pro Ala Leu His Val
1025 1030 1035

Gln Pro Leu Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ser Leu Leu Gln Ala Ser
1040 1045 1050

Thr Gln Pro Glu Val Leu Leu Pro Lys Pro Ala Pro Val Tyr Ser
1055 1060 1065

Asp Ser Asp Leu Val Gln Val Val Asp Glu Leu Ile Gln Glu Ala
1070 1075 1080

Leu Gln Val Asp Cys Glu Glu Val Ser Ser Ala Gly Ala Ala Tyr
1085 1090 1095

Val Ala Ala Ala Leu Gly Val Ser Asn Ala Ala Val Glu Asp Leu
1100 1105 1110

Ile Thr Ala Ala Thr Thr Gly Ile Leu Arg His Val Ala Ala Glu
1115 1120 1125

Glu Val Ser Met Glu Arg Gln Arg Leu Glu Glu Glu Lys Gln Arg
1130 1135 1140

Ala Glu Glu Glu Arg Leu Lys Gln Glu Arg Glu Leu Met Leu Thr
1145 1150 1155

Gln Leu Ser Glu Gly Leu Ala Ala Glu Leu Thr Glu Leu Thr Val
1160 1165 1170

Thr Glu Cys Val Trp Glu Thr Cys Ser Gln Glu Leu Gln Ser Ala
1175 1180 1185

Val Lys Ile Asp Gln Lys Val Arg Val Ala Arg Cys Cys Glu Ala
1190 1195 1200

Val Cys Ala His Leu Val Asp Leu Phe Leu Ala Glu Glu Ile Phe
1205 1210 1215

Gln Thr Ala Lys Glu Thr Leu Gln Glu Leu Gln Cys Phe Cys Lys
1220 1225 1230

Tyr Leu Gln Arg Trp Arg Glu Ala Val Ala Ala Arg Lys Lys Phe
1235 1240 1245

Arg Arg Gln Met Arg Ala Phe Pro Ala Ala Pro Cys Cys Val Asp
1250 1255 1260

Val Asn Asp Arg Leu Gln Ala Leu Val Pro Ser Ala Glu Cys Pro
1265 1270 1275

Ile Thr Glu Glu Asn Leu Ala Lys Gly Leu Leu Asp Leu Gly His
1280 1285 1290

Ala Gly Lys Val Gly Val Ser Cys Thr Arg Leu Arg Arg Leu Arg
1295 1300 1305

Asn Lys Thr Ala His Gln Ile Lys Val Gln His Phe His Gln Gln
1310 1315 1320

Leu Leu Arg Asn Ala Ala Trp Ala Pro Leu Asp Leu Pro Ser Ile
1325 1330 1335

Val Ser Glu His Leu Pro Met Lys Gln Lys Arg Arg Phe Trp Lys
1340 1345 1350

Leu Val Leu Val Leu Pro Asp Val Glu Glu Gln Thr Pro Glu Ser
1355 1360 1365

Pro Gly Arg Ile Leu Glu Asn Trp Leu Lys Val Lys Phe Thr Gly
1370 1375 1380

Asp Asp Ser Met Val Gly Asp Ile Gly Asp Asn Ala Gly Asp Ile
1385 1390 1395

Gln Thr Leu Ser Val Phe Asn Thr Leu Ser Ser Lys Gly Asp Gln
1400 1405 1410

Thr Val Ser Val Asn Val Cys Ile Lys Val Ala His Gly Thr Leu
1415 1420 1425

Ser Asp Ser Ala Leu Asp Ala Val Glu Thr Gln Lys Asp Leu Leu
1430 1435 1440

Gly Thr Ser Gly Leu Met Leu Leu Leu Pro Pro Lys Val Lys Ser
1445 1450 1455

Glu Glu Val Ala Glu Glu Glu Leu Ser Trp Leu Ser Ala Leu Leu
1460 1465 1470

Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln Ala Lys Pro Phe Gln Pro Ala Leu
1475 1480 1485

Pro Leu Val Val Leu Val Pro Ser Ser Arg Gly Asp Ser Ala Gly
1490 1495 1500

Arg Ala Val Glu Asp Gly Leu Met Leu Gln Asp Leu Val Ser Ala
1505 1510 1515

Lys Leu Ile Ser Asp Tyr Ile Val Val Glu Ile Pro Asp Ser Val
1520 1525 1530

Asn Asp Leu Gln Gly Thr Val Lys Val Ser Gly Ala Val Gln Trp
1535 1540 1545

Leu Ile Ser Gly Cys Pro Gln Ala Leu Asp Leu Cys Cys Gln Thr
1550 1555 1560

Leu Val Gln Tyr Val Glu Asp Gly Ile Ser Arg Glu Phe Ser Arg
1565 1570 1575

Arg Phe Phe His Asp Arg Arg Glu Arg Arg Leu Ala Ser Leu Pro
1580 1585 1590

Ser Gln Glu Pro Ser Thr Ile Ile Glu Leu Phe Asn Ser Val Leu
1595 1600 1605

Gln Phe Leu Ala Ser Val Val Ser Ser Glu Gln Leu Cys Asp Ile
1610 1615 1620

Ser Trp Pro Val Met Glu Phe Ala Glu Val Gly Gly Ser Gln Leu
1625 1630 1635

Leu Pro His Leu His Trp Asn Ser Pro Glu His Leu Ala Trp Leu
1640 1645 1650

Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe Gln Leu Pro Gln Met Asp Leu Pro
1655 1660 1665

Pro Pro Gly Ala Pro Trp Leu Pro Val Cys Ser Met Val Ile Gln
1670 1675 1680

Tyr Thr Ser Gln Ile Pro Ser Ser Ser Gln Thr Gln Pro Val Leu
1685 1690 1695

Gln Ser Gln Ala Glu Asn Leu Leu Cys Arg Thr Tyr Gln Lys Trp
1700 1705 1710

Lys Asn Lys Ser Leu Ser Pro Gly Gln Glu Leu Gly Pro Ser Val
1715 1720 1725

Ala Glu Ile Pro Trp Asp Asp Ile Ile Thr Leu Cys Ile Asn His
1730 1735 1740

Lys Leu Arg Asp Trp Thr Pro Pro Arg Leu Pro Val Thr Leu Glu
1745 1750 1755

Ala Leu Ser Glu Asp Gly Gln Ile Cys Val Tyr Phe Phe Lys Asn
1760 1765 1770

Leu Leu Arg Lys Tyr His Val Pro Ser Ser Trp Glu Gln Ala Arg
1775 1780 1785

Met Gln Thr Gln Arg Glu Leu Gln Leu Ser His Gly Arg Ser Gly
1790 1795 1800

Met Arg Ser Ile His Pro Pro Thr Ser Thr Phe Pro Thr Pro Leu
1805 1810 1815

Leu His Val His Gln Lys Gly Lys Lys Lys Glu Glu Ser Gly Arg
1820 1825 1830

Glu Gly Ser Leu Ser Thr Glu Asp Leu Leu Arg Gly Ala Ser Ala
1835 1840 1845

Glu Glu Leu Leu Ala Gln Ser Leu Ser Ser Ser Leu Leu Glu Glu
1850 1855 1860

Lys Glu Glu Asn Lys Arg Phe Glu Asp Gln Leu Gln Gln Trp Leu
1865 1870 1875

Ser Gln Asp Ser Gln Ala Phe Thr Glu Ser Thr Arg Leu Pro Leu
1880 1885 1890

Tyr Leu Pro Gln Thr Leu Val Ser Phe Pro Asp Ser Ile Lys Thr
1895 1900 1905

Gln Thr Met Val Lys Thr Ser Thr Ser Pro Gln Asn Ser Gly Thr
1910 1915 1920

Gly Lys Gln Leu Arg Phe Ser Glu Ala Ser Gly Ser Ser Leu Thr
1925 1930 1935

Glu Lys Leu Lys Leu Leu Glu Arg Leu Ile Gln Ser Ser Arg Ala
1940 1945 1950

Glu Glu Ala Ala Ser Glu Leu His Leu Ser Ala Leu Leu Glu Met
1955 1960 1965

Val Asp Met
1970

<210> 3
<211> 6114
<212> DNA
<213> Homo sapiens

220

〈221〉 CDS

<222> (38) .. (5977)

<400> 3

gtaatactta attacccctt aataattggaa gcagaag atg aac cca act aat cct 55
Met Asn Pro Thr Asn Pro
1 5

ttc agt ggg cag cag cct agt gct ttt tcg gcg tct tct agt aat gta 103
 Phe Ser Gly Gln Gln Pro Ser Ala Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asn Val
 10 15 20

gga aca ctt cca tct aag ccg cca ttt cga ttt ggt caa cct tct ctt 151
 Gly Thr Leu Pro Ser Lys Pro Pro Phe Arg Phe Gly Gln Pro Ser Leu
 25 30 35

ttt gga caa aac agt acc tta tct ggg aag agc tcg gga ttt tca cag 199
 Phe Gly Gln Asn Ser Thr Leu Ser Gly Lys Ser Ser Gly Phe Ser Gln
 40 45 50

gta tcc agc ttt cca gcg tct tct gga gta agt cat tcc tct tca gtg 247
 Val Ser Ser Phe Pro Ala Ser Ser Gly Val Ser His Ser Ser Ser Val
 55 60 65 70

caa aca tta ggg ttc acc caa acc tca agt gtt gga ccc ttt tct gga 295
 Gln Thr Leu Gly Phe Thr Gln Thr Ser Ser Val Gly Pro Phe Ser Gly
 75 80 85

ctt gag cac act tcc acc ttt gtg gct acc tct ggg cct tca agt tca 343
 Leu Glu His Thr Ser Thr Phe Val Ala Thr Ser Gly Pro Ser Ser Ser
 90 95 100

tct gtg ctg gga aac aca gga ttt agt ttt aaa tca ccc acc agt gtt 391
 Ser Val Leu Gly Asn Thr Gly Phe Ser Phe Lys Ser Pro Thr Ser Val
 105 110 115

ggg gct ttc cca agc act tct gct ttt gga caa gaa gct gga gaa ata Gly Ala Phe Pro Ser Thr Ser Ala Phe Gly Gln Glu Ala Gly Glu Ile	439
120 125 130	
 gtg aac tct ggt ttt ggg aaa aca gaa ttc agc ttt aaa cct ctg gaa Val Asn Ser Gly Phe Gly Lys Thr Glu Phe Ser Phe Lys Pro Leu Glu	487
135 140 145 150	
 aat gca gtg ttc aaa cca ata ctg ggg gct gaa tct gag cca gag aaa Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Leu Gly Ala Glu Ser Glu Pro Glu Lys	535
155 160 165	
 acc cag agc caa att gct tct ggg ttt ttt aca ttt tcc cac cca att Thr Gln Ser Gln Ile Ala Ser Gly Phe Phe Thr Phe Ser His Pro Ile	583
170 175 180	
 agt agt gca cct gga ggc ctg gcc cct ttc tct ttt cct caa gta aca Ser Ser Ala Pro Gly Gly Leu Ala Pro Phe Ser Phe Pro Gln Val Thr	631
185 190 195	
 agt agt tca gct acc act tca aat ttt acc ttt tca aaa cct gtt agt Ser Ser Ser Ala Thr Thr Ser Asn Phe Thr Phe Ser Lys Pro Val Ser	679
200 205 210	
 agt aat aat tca tta tct gcc ttt acc cct gct ttg tca aac caa aat Ser Asn Asn Ser Leu Ser Ala Phe Thr Pro Ala Leu Ser Asn Gln Asn	727
215 220 225 230	
 gta gag gaa gag aag aga gga cct aag tca ata ttt gga agt tct aat Val Glu Glu Glu Lys Arg Gly Pro Lys Ser Ile Phe Gly Ser Ser Asn	775
235 240 245	
 aat agc ttc agt agc ttc cct gta tca tct gcg gtt ttg ggc gaa cct Asn Ser Phe Ser Ser Phe Pro Val Ser Ser Ala Val Leu Gly Glu Pro	823
250 255 260	

ttc cag gct agc aaa gca ggt gtc agg cag ggg tgt gaa gaa gct gtt			871
Phe Gln Ala Ser Lys Ala Gly Val Arg Gln Gly Cys Glu Glu Ala Val			
265	270	275	
tcc cag gtg gaa cca ctt ccc agc cta atg aaa gga ctg aaa agg aag			919
Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Ser Leu Met Lys Gly Leu Lys Arg Lys			
280	285	290	
gag gac cag gat cgc tcc cca agg aga cat ggc cac gag cca gca gaa			967
Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg His Gly His Glu Pro Ala Glu			
295	300	305	310
gat tcg gat cct ctg tcc cgg ggc gat cat cct cca gac aaa cga cct			1015
Asp Ser Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp His Pro Pro Asp Lys Arg Pro			
315	320	325	
gtc cgc ctg aat cga ccc cgg gga ggt act tta ttt ggt cgg acg ata			1063
Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly Thr Leu Phe Gly Arg Thr Ile			
330	335	340	
cag gat gtt ttc aaa agc aat aag gaa gta ggt cgt ctg ggc aac aag			1111
Gln Asp Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu Val Gly Arg Leu Gly Asn Lys			
345	350	355	
gag gcc aaa aag gaa act ggc ttt gtt gag tct gca gaa agt gac cac			1159
Glu Ala Lys Lys Glu Thr Gly Phe Val Glu Ser Ala Glu Ser Asp His			
360	365	370	
atg gct atc cca gga ggg aat cag tct gtc ctg gca cct tcc cgg att			1207
Met Ala Ile Pro Gly Gly Asn Gln Ser Val Leu Ala Pro Ser Arg Ile			
375	380	385	390
cca ggt gtg aat aaa gag gaa act gaa agt aga gag aag aaa gaa			1255
Pro Gly Val Asn Lys Glu Glu Glu Thr Glu Ser Arg Glu Lys Lys Glu			
395	400	405	

gat tct cta aga gga act ccg gcg cgt cag agt aac aga agc gag agc			1303
Asp Ser Leu Arg Gly Thr Pro Ala Arg Gln Ser Asn Arg Ser Glu Ser			
410	415	420	
aca gac agt ctt ggg ggc ttg tct ccc tct gaa gtc aca gcc atc cag			1351
Thr Asp Ser Leu Gly Gly Leu Ser Pro Ser Glu Val Thr Ala Ile Gln			
425	430	435	
tgc aag aac atc cct gac tac ctc aac gac agg acc att ctg gag aac			1399
Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp Arg Thr Ile Leu Glu Asn			
440	445	450	
cat ttt ggc aaa att gct aaa gtg cag cgc atc ttt acc agg cgc agc			1447
His Phe Gly Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg Ile Phe Thr Arg Arg Ser			
455	460	465	470
aaa aag ctt gca gtg gta cat ttc ttt gat cat gca tct gca gcc ctg			1495
Lys Lys Leu Ala Val Val His Phe Phe Asp His Ala Ser Ala Ala Leu			
475	480	485	
gct aga aag aag ggg aaa agt ttg cat aaa gac atg gct atc ttt tgg			1543
Ala Arg Lys Lys Gly Lys Ser Leu His Lys Asp Met Ala Ile Phe Trp			
490	495	500	
cac agg aag aaa ata agc ccc aat aag aaa ccc ttt tcc ctg aag gag			1591
His Arg Lys Lys Ile Ser Pro Asn Lys Lys Pro Phe Ser Leu Lys Glu			
505	510	515	
aag aaa cca ggt gac ggt gaa gtc agc ccg agc aca gag gat gca ccc			1639
Lys Lys Pro Gly Asp Gly Glu Val Ser Pro Ser Thr Glu Asp Ala Pro			
520	525	530	
ttt cag cac tct cct ctt ggc aag gcc gca ggg agg act ggt gct agc			1687
Phe Gln His Ser Pro Leu Gly Lys Ala Ala Gly Arg Thr Gly Ala Ser			
535	540	545	550

agc ctc ctg aat aaa agc tct cca gtg aag aag cca agt ctt cta aag			1735
Ser Leu Leu Asn Lys Ser Ser Pro Val Lys Lys Pro Ser Leu Leu Lys			
555	560	565	
gcc cac caa ttc gag gga gac tct ttt gac tca gcc tcc gag ggc tcc			1783
Ala His Gln Phe Glu Gly Asp Ser Phe Asp Ser Ala Ser Glu Gly Ser			
570	575	580	
gag ggc ctc ggg cca tgt gtg ctc tcc ctc agt acc ctg ata ggc act			1831
Glu Gly Leu Gly Pro Cys Val Leu Ser Leu Ser Thr Leu Ile Gly Thr			
585	590	595	
gtg,gct gag aca tcc aag gag aag tac cgc ctg ctt gac cag aga gac			1879
Val Ala Glu Thr Ser Lys Glu Lys Tyr Arg Leu Leu Asp Gln Arg Asp			
600	605	610	
agg atc atg cgg caa gct cgg gtg aag aga acc gat ctg gac aaa gcg			1927
Arg Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg Thr Asp Leu Asp Lys Ala			
615	620	625	630
agg act ttt gtt ggc acc tgc ctg gat atg tgt cct gag aag gag agg			1975
Arg Thr Phe Val Gly Thr Cys Leu Asp Met Cys Pro Glu Lys Glu Arg			
635	640	645	
tac atg cgg gag acc cgt agc cag ctg agc gtg ttc gaa gtg gtc cca			2023
Tyr Met Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser Val Phe Glu Val Val Pro			
650	655	660	
ggg act gac cag gtg gac cac gca gca gct gtg aaa gag tac agt cgg			2071
Gly Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Ala Val Lys Glu Tyr Ser Arg			
665	670	675	
tcc tcg gcg gat cag gag gag ccc ctg ccc cac gag ctg cgg ccc ttg			2119
Ser Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro His Glu Leu Arg Pro Leu			
680	685	690	

cca gtg ctc agc agg acc atg gac tac ctg gtg acc cag atc atg gac			2167
Pro Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu Val Thr Gln Ile Met Asp			
695	700	705	710
cag aag gag ggc agc ctg cgg gat tgg tat gac ttc gtg tgg aac cgc			2215
Gln Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr Asp Phe Val Trp Asn Arg			
715	720	725	
acg cgt ggc ata cgg aag gat atc acg cag cac ctc tgt gac ccc			2263
Thr Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln Gln His Leu Cys Asp Pro			
730	735	740	
ctg acg gtg tcc ctg att gag aag tgc acc cgg ttt cac atc cac tgt			2311
Leu Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr Arg Phe His Ile His Cys			
745	750	755	
gcc cac ttc atg tgt gag gag ccc atg tcc tcc ttt gat gcc aag atc			2359
Ala His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser Ser Phe Asp Ala Lys Ile			
760	765	770	
aat aat gag aac atg acc aag tgc ctg cag agc ctg aag gag atg tac			2407
Asn Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln Ser Leu Lys Glu Met Tyr			
775	780	785	790
cag gac ctg aga aac aag ggt gtc ttc tgt gcc agc gaa gcg gag ttc			2455
Gln Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys Ala Ser Glu Ala Glu Phe			
795	800	805	
cag ggc tac aat gtt ctg ctc agt ctc aac aag gga gac atc cta aga			2503
Gln Gly Tyr Asn Val Leu Leu Ser Leu Asn Lys Gly Asp Ile Leu Arg			
810	815	820	
gaa gta caa cag ttc cat cct gct gtt aga aac tca tct gag gtg aaa			2551
Glu Val Gln Gln Phe His Pro Ala Val Arg Asn Ser Ser Glu Val Lys			
825	830	835	

ttt gct gtt cag gct ttt gct gca ttg aac agt aat aat ttt gtg aga			2599
Phe Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn Ser Asn Asn Phe Val Arg			
840	845	850	
ttt ttc aaa ctg gtc cag tca gct tct tac ctg aac gct tgt ctt tta			2647
Phe Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr Leu Asn Ala Cys Leu Leu			
855	860	865	870
cac tgt tac ttc agt cag atc cgc aag gat gct ctc cgg gcg ctc aac			2695
His Cys Tyr Phe Ser Gln Ile Arg Lys Asp Ala Leu Arg Ala Leu Asn			
875	880	885	
ttt gcg tac acg gtg agc aca cag cga tct acc atc ttt ccc ctg gat			2743
Phe Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser Thr Ile Phe Pro Leu Asp			
890	895	900	
ggg gtg gtg cgc atg ctg ctg ttc aga gac tgt gaa gag gcc acc gac			2791
Gly Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp Cys Glu Ala Thr Asp			
905	910	915	
ttc ctc acc tgc cac ggc ctc acc gtt tcc gac ggc tgt gtg gag ctg			2839
Phe Leu Thr Cys His Gly Leu Thr Val Ser Asp Gly Cys Val Glu Leu			
920	925	930	
aac cgg tct gca ttc ctg gaa cca gag gga tta tcc aag acc agg aag			2887
Asn Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly Leu Ser Lys Thr Arg Lys			
935	940	945	950
tcg gtg ttt att act agg aag ctg acg gtg tca gtc ggg gaa att gtg			2935
Ser Val Phe Ile Thr Arg Lys Leu Thr Val Ser Val Gly Glu Ile Val			
955	960	965	
aac gga ggg cca ttg ccc ccc gtc cct cgt cac acc cct gtg tgc agc			2983
Asn Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg His Thr Pro Val Cys Ser			
970	975	980	

ttc aac tcc cag aac aag tac atc ggg gag agc ctg gcc gcg gag ctg		3031
Phe Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Ile Gly Glu Ser Leu Ala Ala Glu Leu		
985	990	995
ccc gtc agc acc cag aga ccc ggc tcc gac aca gtg ggc gga ggg		3076
Pro Val Ser Thr Gln Arg Pro Gly Ser Asp Thr Val Gly Gly Gly		
1000	1005	1010
aga gga gag gag tgt ggt gta gag ccg gat gca ccc ctg tcc agt		3121
Arg Gly Glu Glu Cys Gly Val Glu Pro Asp Ala Pro Leu Ser Ser		
1015	1020	1025
ctc cca cag tct cta cca gcc cct gcg ccc tca cca gtg cct ctg		3166
Leu Pro Gln Ser Leu Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro Val Pro Leu		
1030	1035	1040
cct cct gtc ctg gca ctg acc ccg tct gtg gcg ccc agc ctc ttc		3211
Pro Pro Val Leu Ala Leu Thr Pro Ser Val Ala Pro Ser Leu Phe		
1045	1050	1055
cag ctg tct gtg cag cct gaa cca ccg cct cca gag ccc gtg ccc		3256
Gln Leu Ser Val Gln Pro Glu Pro Pro Pro Glu Pro Val Pro		
1060	1065	1070
atg tac tct gac gag gac ctg gcg cag gtg gtg gac gag ctc atc		3301
Met Tyr Ser Asp Glu Asp Leu Ala Gln Val Val Asp Glu Leu Ile		
1075	1080	1085
cag gag gcc ctg cag agg gac tgt gag gaa gtt ggc tct gcg ggt		3346
Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Cys Glu Glu Val Gly Ser Ala Gly		
1090	1095	1100
gct gcc tac gca gct gcc gcc ctg ggt gtt tct aat gct gct atg		3391
Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Leu Gly Val Ser Asn Ala Ala Met		
1105	1110	1115

gag	gat	ttg	tta	aca	gct	gca	acc	acg	ggc	att	ttg	agg	cac	att	3436
Glu	Asp	Leu	Leu	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Gly	Ile	Leu	Arg	His	Ile	
1120							1125				1130				
gca	gct	gaa	gaa	gtg	tct	aag	gaa	aga	gag	cga	agg	gag	cag	gag	3481
Ala	Ala	Glu	Glu	Val	Ser	Lys	Glu	Arg	Glu	Arg	Arg	Glu	Gln	Glu	
1135							1140				1145				
agg	cag	cgg	gct	gaa	gag	gaa	agg	ttg	aaa	caa	gag	aga	gag	ctg	3526
Arg	Gln	Arg	Ala	Glu	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Gln	Glu	Arg	Glu	Leu	
1150							1155				1160				
gtg	tta	agt	gag	ctg	agc	cag	ggc	ctg	gcc	gtg	gag	ctg	atg	gaa	3571
Val	Leu	Ser	Glu	Leu	Ser	Gln	Gly	Leu	Ala	Val	Glu	Leu	Met	Glu	
1165							1170				1175				
cgc	gtg	atg	atg	gag	ttt	gtg	agg	gaa	acc	tgc	tcc	cag	gag	ttg	3616
Arg	Val	Met	Met	Glu	Phe	Val	Arg	Glu	Thr	Cys	Ser	Gln	Glu	Leu	
1180							1185				1190				
aag	aat	gca	gta	gag	aca	gac	cag	agg	gtc	cgt	gtg	gcc	cgt	tgc	3661
Lys	Asn	Ala	Val	Glu	Thr	Asp	Gln	Arg	Val	Arg	Val	Ala	Arg	Cys	
1195							1200				1205				
tgt	gag	gat	gtc	tgt	gcc	cac	tta	gtg	gac	ttt	ctc	gtg	gag		3706
Cys	Glu	Asp	Val	Cys	Ala	His	Leu	Val	Asp	Leu	Phe	Leu	Val	Glu	
1210							1215				1220				
gaa	atc	ttc	cag	act	gca	aag	gag	acc	ctc	cag	gag	ctt	cag	tgc	3751
Glu	Ile	Phe	Gln	Thr	Ala	Lys	Glu	Thr	Leu	Gln	Glu	Leu	Gln	Cys	
1225							1230				1235				
ttc	tgc	aag	tat	cta	cag	cgg	tgg	agg	gaa	gct	gtc	aca	gcc	cgc	3796
Phe	Cys	Lys	Tyr	Leu	Gln	Arg	Trp	Arg	Glu	Ala	Val	Thr	Ala	Arg	
1240							1245				1250				

aag aaa	ctg agg cgc caa atg	cg ^g gct ttc cct gct	g ^c g ccc tgc	3841
Lys Lys	Leu Arg Arg Gln Met	Arg Ala Phe Pro Ala	Ala Pro Cys	
1255	1260	1265		
tgc gtg	gac gtg agc gac cg ^g	ctg agg g ^c g ctg g ^c g	ccc agc gca	3886
Cys Val	Asp Val Ser Asp Arg	Leu Arg Ala Leu Ala	Pro Ser Ala	
1270	1275	1280		
gag tgc	ccc att gct gaa gag	aac ctg gcc agg ggc	ctc ctg gac	3931
Glu Cys	Pro Ile Ala Glu Glu	Asn Leu Ala Arg Gly	Leu Leu Asp	
1285	1290	1295		
ctg ggc	cat gca ggg aga ttg	ggc atc tct tgc acc	agg tta agg	3976
Leu Gly	His Ala Gly Arg Leu	Gly Ile Ser Cys Thr	Arg Leu Arg	
1300	1305	1310		
cg ^g ctc	aga aac aag aca gct	cac cag atg aag gtt	cag cac ttc	4021
Arg Leu	Arg Asn Lys Thr Ala	His Gln Met Lys Val	Gln His Phe	
1315	1320	1325		
ta ^c cag	cag ctg ctg agt gat	gtg gca tgg g ^c g tct	ctg gac ctg	4066
Tyr Gln	Gln Leu Leu Ser Asp	Val Ala Trp Ala Ser	Leu Asp Leu	
1330	1335	1340		
cca tcc	ctc gtg gct gag cac	ctc cct ggg agg cag	gag cat gtg	4111
Pro Ser	Leu Val Ala Glu His	Leu Pro Gly Arg Gln	Glu His Val	
1345	1350	1355		
ttt tgg	aag ctg gtg ctg gtg	ttg ccg gat gta gag	gag cag tcc	4156
Phe Trp	Lys Leu Val Leu Val	Leu Pro Asp Val Glu	Glu Gln Ser	
1360	1365	1370		
cca gag	agt tgt ggc aga att	cta gca aat tgg tta	aaa gtc aag	4201
Pro Glu	Ser Cys Gly Arg Ile	Leu Ala Asn Trp Leu	Lys Val Lys	
1375	1380	1385		

ttc atg gga gat gaa ggc tca	gtg gat gac aca tcc	agc gat gct	4246
Phe Met Gly Asp Glu Gly Ser	Val Asp Asp Thr Ser	Ser Asp Ala	
1390	1395	1400	
ggt ggg att cag acg ctt tcg	ctt ttc aac tca ctt	agc agc aaa	4291
Gly Gly Ile Gln Thr Leu Ser	Leu Phe Asn Ser Leu	Ser Ser Lys	
1405	1410	1415	
ggg gat cag atg att tct gtt	aac gtg tgt ata aag	gtg gcc cat	4336
Gly Asp Gln Met Ile Ser Val	Asn Val Cys Ile Lys	Val Ala His	
1420	1425	1430	
ggc gcc ctc agt gat ggt gcc	att gat gct gtg gag	aca cag aag	4381
Gly Ala Leu Ser Asp Gly Ala	Ile Asp Ala Val Glu	Thr Gln Lys	
1435	1440	1445	
gac ctc ctg gga gcc agt ggg	ctc atg ctg ctg ctt	ccc ccc aaa	4426
Asp Leu Leu Gly Ala Ser Gly	Leu Met Leu Leu Leu	Pro Pro Lys	
1450	1455	1460	
atg aag agt gag gac atg gca	gag gag gac gtg tac	tgg ctg tcg	4471
Met Lys Ser Glu Asp Met Ala	Glu Glu Asp Val Tyr	Trp Leu Ser	
1465	1470	1475	
gcc ttg ctg cag ctc aag cag	ctc ctg cag gct aag	ccc ttc cag	4516
Ala Leu Leu Gln Leu Lys Gln	Leu Leu Gln Ala Lys	Pro Phe Gln	
1480	1485	1490	
cct gcg ctt cct ctg gtg gtt	ctt gtg cct agc cca	gga ggg gac	4561
Pro Ala Leu Pro Leu Val Val	Leu Val Pro Ser Pro	Gly Gly Asp	
1495	1500	1505	
gcc gtt gag aag gaa gta gaa	gat ggt ctg atg cta	cag gac ttg	4606
Ala Val Glu Lys Glu Val Glu	Asp Gly Leu Met Leu	Gln Asp Leu	
1510	1515	1520	

gtt tca	gct aag ctg att tca	gat tac act gtt acc	gag atc cct	4651
Val Ser	Ala Lys Leu Ile Ser	Asp Tyr Thr Val Thr	Glu Ile Pro	
1525	1530	1535		
gat acc	att aat gat cta caa	ggt tca act aag gtt	ttg caa gca	4696
Asp Thr	Ile Asn Asp Leu Gln	Gly Ser Thr Lys Val	Leu Gln Ala	
1540	1545	1550		
gtg cag	tgg ctg gtt tcc cac	tgc ccc cat tcc ctt	gac ctc tgc	4741
Val Gln	Trp Leu Val Ser His	Cys Pro His Ser Leu	Asp Leu Cys	
1555	1560	1565		
tgc cag	act ctc att cag tac	gtc gaa gac ggg att	ggc cat gag	4786
Cys Gln	Thr Leu Ile Gln Tyr	Val Glu Asp Gly Ile	Gly His Glu	
1570	1575	1580		
ttt agt	ggc cgc ttt ttc cat	gac aga aga gag agg	cgt ctg ggc	4831
Phe Ser	Gly Arg Phe Phe His	Asp Arg Arg Glu Arg	Arg Leu Gly	
1585	1590	1595		
ggt ctt	gct tct cag gag cct	ggc gcc atc att gag	ctg ttt aac	4876
Gly Leu	Ala Ser Gln Glu Pro	Gly Ala Ile Ile Glu	Leu Phe Asn	
1600	1605	1610		
agt gtg	ctg cag ttc ctg gct	tct gtg gtg tcc tct	gaa cag ctg	4921
Ser Val	Leu Gln Phe Leu Ala	Ser Val Val Ser Ser	Glu Gln Leu	
1615	1620	1625		
tgt gac	ctg tcc tgg cct gtc	act gag ttt gct gag	gca ggg ggc	4966
Cys Asp	Leu Ser Trp Pro Val	Thr Glu Phe Ala Glu	Ala Gly Gly	
1630	1635	1640		
agc cgg	ctg ctt cct cac ctg	cac tgg aat gcc cca	gag cac ctg	5011
Ser Arg	Leu Leu Pro His Leu	His Trp Asn Ala Pro	Glu His Leu	
1645	1650	1655		

gcc tgg ctg aag cag gct gtg	ctc ggg ttc cag ctt	ccg cag atg	5056
Ala Trp Leu Lys Gln Ala Val	Leu Gly Phe Gln Leu	Pro Gln Met	
1660	1665	1670	
gac ctt cca ccc ctg ggg gcc	ccc tgg ctc ccc gtg	tgc tcc atg	5101
Asp Leu Pro Pro Leu Gly Ala	Pro Trp Leu Pro Val	Cys Ser Met	
1675	1680	1685	
gtt gtc cag tac gcc tcc cag	atc ccc agc tca cgc	cag aca cag	5146
Val Val Gln Tyr Ala Ser Gln	Ile Pro Ser Ser Arg	Gln Thr Gln	
1690	1695	1700	
cct gtc ctc cag tcc cag gtg	gag aac ctg ctc cac	aga acc tac	5191
Pro Val Leu Gln Ser Gln Val	Glu Asn Leu Leu His	Arg Thr Tyr	
1705	1710	1715	
tgt agg tgg aag agc aag agt	ccc tcc cca gtc cat	ggg gca ggc	5236
Cys Arg Trp Lys Ser Lys Ser	Pro Ser Pro Val His	Gly Ala Gly	
1720	1725	1730	
ccc tcg gtc atg gag atc cca	tgg gat gat ctt atc	gcc ttg tgt	5281
Pro Ser Val Met Glu Ile Pro	Trp Asp Asp Leu Ile	Ala Leu Cys	
1735	1740	1745	
atc aac cac aag ctg aga gac	tgg acg ccc ccc cg	ctt cct gtt	5326
Ile Asn His Lys Leu Arg Asp	Trp Thr Pro Pro Arg	Leu Pro Val	
1750	1755	1760	
aca tca gag gcg ctg agt gaa	gat ggt cag ata tgt	gtg tat ttt	5371
Thr Ser Glu Ala Leu Ser Glu	Asp Gly Gln Ile Cys	Val Tyr Phe	
1765	1770	1775	
ttt aaa aac gat ttg aaa aaa	tat gat gtt cct ttg	tcg tgg gaa	5416
Phe Lys Asn Asp Leu Lys Lys	Tyr Asp Val Pro Leu	Ser Trp Glu	
1780	1785	1790	

caa gcc	agg ttg cag acg cag	aag gag cta cag ctg	aga gag gga	5461
Gln Ala	Arg Leu Gln Thr Gln	Lys Glu Leu Gln Leu	Arg Glu Gly	
1795	1800	1805		
cgt ttg	gca ata aag cct ttt	cat cct tct gca aac	aat ttt ccc	5506
Arg Leu	Ala Ile Lys Pro Phe	His Pro Ser Ala Asn	Asn Phe Pro	
1810	1815	1820		
ata cca	ttg ctt cac atg cac	cgt aac tgg aag agg	agc aca gag	5551
Ile Pro	Leu Leu His Met His	Arg Asn Trp Lys Arg	Ser Thr Glu	
1825	1830	1835		
tgt gct	caa gag ggg agg att	ccc agc aca gag gat	ctg atg cga	5596
Cys Ala	Gln Glu Gly Arg Ile	Pro Ser Thr Glu Asp	Leu Met Arg	
1840	1845	1850		
gga gct	tct gag gag ctc	ttg gcg cag tgt ttg	tcg agc agt	5641
Gly Ala	Ser Ala Glu Glu Leu	Leu Ala Gln Cys Leu	Ser Ser Ser	
1855	1860	1865		
ctg ctg	ctg gag aaa gaa gag	aac aag agg ttt gaa	gat cag ctt	5686
Leu Leu	Leu Glu Lys Glu Glu	Asn Lys Arg Phe Glu	Asp Gln Leu	
1870	1875	1880		
cag caa	tgg ttg tct gaa gac	tca gga gca ttt acg	gat tta act	5731
Gln Gln	Trp Leu Ser Glu Asp	Ser Gly Ala Phe Thr	Asp Leu Thr	
1885	1890	1895		
tcc ctt	ccc ctc tat ctt cct	cag act cta gtg tct	ctt tct cac	5776
Ser Leu	Pro Leu Tyr Leu Pro	Gln Thr Leu Val Ser	Leu Ser His	
1900	1905	1910		
act att	gaa cct gtg atg aaa	aca tct gta act act	agc cca cag	5821
Thr Ile	Glu Pro Val Met Lys	Thr Ser Val Thr Thr	Ser Pro Gln	
1915	1920	1925		

agt gac atg atg agg gag caa ctg cag ctg tca gag gcg aca gga 5866
 Ser Asp Met Met Arg Glu Gln Leu Gln Leu Ser Glu Ala Thr Gly
 1930 1935 1940

acg tgt cta ggc gaa cga cta aag cac ctg gaa agg ctg atc cg 5911
 Thr Cys Leu Gly Glu Arg Leu Lys His Leu Glu Arg Leu Ile Arg
 1945 1950 1955

agt tca agg gaa gag gaa gtt gcc tct gag ctc cat ctc tct gcg 5956
 Ser Ser Arg Glu Glu Glu Val Ala Ser Glu Leu His Leu Ser Ala
 1960 1965 1970

ctg cta gac atg gtg gac att tgaggcgcct gaccgtggg gagggggct 6007
 Leu Leu Asp Met Val Asp Ile
 1975 1980

ctccccaga gtttctgttt ttactcaaaa taatgttatt ctcagatgct tgatgcactg 6067
 ttggaaatgt gattaattt atcatgcaga taaaccattt aaatgtc 6114

<210> 4
 <211> 1980
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asn Pro Thr Asn Pro Phe Ser Gly Gln Gln Pro Ser Ala Phe Ser
 1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Asn Val Gly Thr Leu Pro Ser Lys Pro Pro Phe Arg
 20 25 30

Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn Ser Thr Leu Ser Gly Lys
35 40 45

Ser Ser Gly Phe Ser Gln Val Ser Ser Phe Pro Ala Ser Ser Gly Val
50 55 60

Ser His Ser Ser Ser Val Gln Thr Leu Gly Phe Thr Gln Thr Ser Ser
65 70 75 80

Val Gly Pro Phe Ser Gly Leu Glu His Thr Ser Thr Phe Val Ala Thr
85 90 95

Ser Gly Pro Ser Ser Ser Val Leu Gly Asn Thr Gly Phe Ser Phe
100 105 110

Lys Ser Pro Thr Ser Val Gly Ala Phe Pro Ser Thr Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Gln Glu Ala Gly Glu Ile Val Asn Ser Gly Phe Gly Lys Thr Glu Phe
130 135 140

Ser Phe Lys Pro Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Leu Gly Ala
145 150 155 160

Glu Ser Glu Pro Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ala Ser Gly Phe Phe
165 170 175

Thr Phe Ser His Pro Ile Ser Ser Ala Pro Gly Gly Leu Ala Pro Phe
180 185 190

Ser Phe Pro Gln Val Thr Ser Ser Ser Ala Thr Thr Ser Asn Phe Thr
195 200 205

Phe Ser Lys Pro Val Ser Ser Asn Asn Ser Leu Ser Ala Phe Thr Pro
210 215 220

Ala Leu Ser Asn Gln Asn Val Glu Glu Glu Lys Arg Gly Pro Lys Ser
225 230 235 240

Ile Phe Gly Ser Ser Asn Asn Ser Phe Ser Ser Phe Pro Val Ser Ser
245 250 255

Ala Val Leu Gly Glu Pro Phe Gln Ala Ser Lys Ala Gly Val Arg Gln
260 265 270

Gly Cys Glu Glu Ala Val Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Ser Leu Met
275 280 285

Lys Gly Leu Lys Arg Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg His
290 295 300

Gly His Glu Pro Ala Glu Asp Ser Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp His
305 310 315 320

Pro Pro Asp Lys Arg Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly Thr
325 330 335

Leu Phe Gly Arg Thr Ile Gln Asp Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu Val
340 345 350

Gly Arg Leu Gly Asn Lys Glu Ala Lys Lys Glu Thr Gly Phe Val Glu
355 360 365

Ser Ala Glu Ser Asp His Met Ala Ile Pro Gly Gly Asn Gln Ser Val
370 375 380

Leu Ala Pro Ser Arg Ile Pro Gly Val Asn Lys Glu Glu Glu Thr Glu
385 390 395 400

Ser Arg Glu Lys Lys Glu Asp Ser Leu Arg Gly Thr Pro Ala Arg Gln
405 410 415

Ser Asn Arg Ser Glu Ser Thr Asp Ser Leu Gly Gly Leu Ser Pro Ser
420 425 430

Glu Val Thr Ala Ile Gln Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp
435 440 445

Arg Thr Ile Leu Glu Asn His Phe Gly Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg
450 455 460

Ile Phe Thr Arg Arg Ser Lys Lys Leu Ala Val Val His Phe Phe Asp
465 470 475 480

His Ala Ser Ala Ala Leu Ala Arg Lys Lys Gly Lys Ser Leu His Lys
485 490 495

Asp Met Ala Ile Phe Trp His Arg Lys Lys Ile Ser Pro Asn Lys Lys
500 505 510

Pro Phe Ser Leu Lys Glu Lys Lys Pro Gly Asp Gly Glu Val Ser Pro
515 520 525

Ser Thr Glu Asp Ala Pro Phe Gln His Ser Pro Leu Gly Lys Ala Ala
530 535 540

Gly Arg Thr Gly Ala Ser Ser Leu Leu Asn Lys Ser Ser Pro Val Lys
545 550 555 560

Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala His Gln Phe Glu Gly Asp Ser Phe Asp
565 570 575

Ser Ala Ser Glu Gly Ser Glu Gly Leu Gly Pro Cys Val Leu Ser Leu
580 585 590

Ser Thr Leu Ile Gly Thr Val Ala Glu Thr Ser Lys Glu Lys Tyr Arg
595 600 605

Leu Leu Asp Gln Arg Asp Arg Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg
610 615 620

Thr Asp Leu Asp Lys Ala Arg Thr Phe Val Gly Thr Cys Leu Asp Met
625 630 635 640

Cys Pro Glu Lys Glu Arg Tyr Met Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser
645 650 655

Val Phe Glu Val Val Pro Gly Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Ala
660 665 670

Val Lys Glu Tyr Ser Arg Ser Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro
675 680 685

His Glu Leu Arg Pro Leu Pro Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu
690 695 700

Val Thr Gln Ile Met Asp Gln Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr
705 710 715 720

Asp Phe Val Trp Asn Arg Thr Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln
725 730 735

Gln His Leu Cys Asp Pro Leu Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr
740 745 750

Arg Phe His Ile His Cys Ala His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser
755 760 765

Ser Phe Asp Ala Lys Ile Asn Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln
770 775 780

Ser Leu Lys Glu Met Tyr Gln Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys
785 790 795 800

Ala Ser Glu Ala Glu Phe Gln Gly Tyr Asn Val Leu Leu Ser Leu Asn
805 810 815

Lys Gly Asp Ile Leu Arg Glu Val Gln Gln Phe His Pro Ala Val Arg
820 825 830

Asn Ser Ser Glu Val Lys Phe Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn
835 840 845

Ser Asn Asn Phe Val Arg Phe Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr
850 855 860

Leu Asn Ala Cys Leu Leu His Cys Tyr Phe Ser Gln Ile Arg Lys Asp
865 870 875 880

Ala Leu Arg Ala Leu Asn Phe Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser
885 890 895

Thr Ile Phe Pro Leu Asp Gly Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp
900 905 910

Cys Glu Glu Ala Thr Asp Phe Leu Thr Cys His Gly Leu Thr Val Ser
915 920 925

Asp Gly Cys Val Glu Leu Asn Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly
930 935 940

Leu Ser Lys Thr Arg Lys Ser Val Phe Ile Thr Arg Lys Leu Thr Val
945 950 955 960

Ser Val Gly Glu Ile Val Asn Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg
965 970 975

His Thr Pro Val Cys Ser Phe Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Ile Gly Glu
980 985 990

Ser Leu Ala Ala Glu Leu Pro Val Ser Thr Gln Arg Pro Gly Ser Asp
995 1000 1005

Thr Val Gly Gly Arg Gly Glu Glu Cys Gly Val Glu Pro Asp
1010 1015 1020

Ala Pro Leu Ser Ser Leu Pro Gln Ser Leu Pro Ala Pro Ala Pro
1025 1030 1035

Ser Pro Val Pro Leu Pro Pro Val Leu Ala Leu Thr Pro Ser Val
1040 1045 1050

Ala Pro Ser Leu Phe Gln Leu Ser Val Gln Pro Glu Pro Pro Pro
1055 1060 1065

Pro Glu Pro Val Pro Met Tyr Ser Asp Glu Asp Leu Ala Gln Val
1070 1075 1080

Val Asp Glu Leu Ile Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Cys Glu Glu
1085 1090 1095

Val Gly Ser Ala Gly Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Leu Gly Val
1100 1105 1110

Ser Asn Ala Ala Met Glu Asp Leu Leu Thr Ala Ala Thr Thr Gly
1115 1120 1125

Ile Leu Arg His Ile Ala Ala Glu Glu Val Ser Lys Glu Arg Glu
1130 1135 1140

Arg Arg Glu Gln Glu Arg Gln Arg Ala Glu Glu Glu Arg Leu Lys
1145 1150 1155

Gln Glu Arg Glu Leu Val Leu Ser Glu Leu Ser Gln Gly Leu Ala
1160 1165 1170

Val Glu Leu Met Glu Arg Val Met Met Glu Phe Val Arg Glu Thr
1175 1180 1185

Cys Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ala Val Glu Thr Asp Gln Arg Val
1190 1195 1200

Arg Val Ala Arg Cys Cys Glu Asp Val Cys Ala His Leu Val Asp
1205 1210 1215

Leu Phe Leu Val Glu Glu Ile Phe Gln Thr Ala Lys Glu Thr Leu
1220 1225 1230

Gln Glu Leu Gln Cys Phe Cys Lys Tyr Leu Gln Arg Trp Arg Glu
1235 1240 1245

Ala Val Thr Ala Arg Lys Lys Leu Arg Arg Gln Met Arg Ala Phe
1250 1255 1260

Pro Ala Ala Pro Cys Cys Val Asp Val Ser Asp Arg Leu Arg Ala
1265 1270 1275

Leu Ala Pro Ser Ala Glu Cys Pro Ile Ala Glu Glu Asn Leu Ala
1280 1285 1290

Arg Gly Leu Leu Asp Leu Gly His Ala Gly Arg Leu Gly Ile Ser
1295 1300 1305

Cys Thr Arg Leu Arg Arg Leu Arg Asn Lys Thr Ala His Gln Met
1310 1315 1320

Lys Val Gln His Phe Tyr Gln Gln Leu Leu Ser Asp Val Ala Trp
1325 1330 1335

Ala Ser Leu Asp Leu Pro Ser Leu Val Ala Glu His Leu Pro Gly
1340 1345 1350

Arg Gln Glu His Val Phe Trp Lys Leu Val Leu Val Leu Pro Asp
1355 1360 1365

Val Glu Glu Gln Ser Pro Glu Ser Cys Gly Arg Ile Leu Ala Asn
1370 1375 1380

Trp Leu Lys Val Lys Phe Met Gly Asp Glu Gly Ser Val Asp Asp
1385 1390 1395

Thr Ser Ser Asp Ala Gly Gly Ile Gln Thr Leu Ser Leu Phe Asn
1400 1405 1410

Ser Leu Ser Ser Lys Gly Asp Gln Met Ile Ser Val Asn Val Cys
1415 1420 1425

Ile Lys Val Ala His Gly Ala Leu Ser Asp Gly Ala Ile Asp Ala
1430 1435 1440

Val Glu Thr Gln Lys Asp Leu Leu Gly Ala Ser Gly Leu Met Leu
1445 1450 1455

Leu Leu Pro Pro Lys Met Lys Ser Glu Asp Met Ala Glu Glu Asp
1460 1465 1470

Val Tyr Trp Leu Ser Ala Leu Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln
1475 1480 1485

Ala Lys Pro Phe Gln Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Val Pro
1490 1495 1500

Ser Pro Gly Gly Asp Ala Val Glu Lys Glu Val Glu Asp Gly Leu
1505 1510 1515

Met Leu Gln Asp Leu Val Ser Ala Lys Leu Ile Ser Asp Tyr Thr
1520 1525 1530

Val Thr Glu Ile Pro Asp Thr Ile Asn Asp Leu Gln Gly Ser Thr
1535 1540 1545

Lys Val Leu Gln Ala Val Gln Trp Leu Val Ser His Cys Pro His
1550 1555 1560

Ser Leu Asp Leu Cys Cys Gln Thr Leu Ile Gln Tyr Val Glu Asp
1565 1570 1575

Gly Ile Gly His Glu Phe Ser Gly Arg Phe Phe His Asp Arg Arg
1580 1585 1590

Glu Arg Arg Leu Gly Gly Leu Ala Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ile
1595 1600 1605

Ile Glu Leu Phe Asn Ser Val Leu Gln Phe Leu Ala Ser Val Val
1610 1615 1620

Ser Ser Glu Gln Leu Cys Asp Leu Ser Trp Pro Val Thr Glu Phe
1625 1630 1635

Ala Glu Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu Pro His Leu His Trp Asn
1640 1645 1650

Ala Pro Glu His Leu Ala Trp Leu Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe
1655 1660 1665

Gln Leu Pro Gln Met Asp Leu Pro Pro Leu Gly Ala Pro Trp Leu
1670 1675 1680

Pro Val Cys Ser Met Val Val Gln Tyr Ala Ser Gln Ile Pro Ser
1685 1690 1695

Ser Arg Gln Thr Gln Pro Val Leu Gln Ser Gln Val Glu Asn Leu
1700 1705 1710

Leu His Arg Thr Tyr Cys Arg Trp Lys Ser Lys Ser Pro Ser Pro
1715 1720 1725

Val His Gly Ala Gly Pro Ser Val Met Glu Ile Pro Trp Asp Asp
1730 1735 1740

Leu Ile Ala Leu Cys Ile Asn His Lys Leu Arg Asp Trp Thr Pro
1745 1750 1755

Pro Arg Leu Pro Val Thr Ser Glu Ala Leu Ser Glu Asp Gly Gln
1760 1765 1770

Ile Cys Val Tyr Phe Phe Lys Asn Asp Leu Lys Lys Tyr Asp Val
1775 1780 1785

Pro Leu Ser Trp Glu Gln Ala Arg Leu Gln Thr Gln Lys Glu Leu
1790 1795 1800

Gln Leu Arg Glu Gly Arg Leu Ala Ile Lys Pro Phe His Pro Ser
1805 1810 1815

Ala Asn Asn Phe Pro Ile Pro Leu Leu His Met His Arg Asn Trp
1820 1825 1830

Lys Arg Ser Thr Glu Cys Ala Gln Glu Gly Arg Ile Pro Ser Thr
1835 1840 1845

Glu Asp Leu Met Arg Gly Ala Ser Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gln
1850 1855 1860

Cys Leu Ser Ser Ser Leu Leu Leu Glu Lys Glu Glu Asn Lys Arg
1865 1870 1875

Phe Glu Asp Gln Leu Gln Gln Trp Leu Ser Glu Asp Ser Gly Ala
1880 1885 1890

Phe Thr Asp Leu Thr Ser Leu Pro Leu Tyr Leu Pro Gln Thr Leu
1895 1900 1905

Val Ser Leu Ser His Thr Ile Glu Pro Val Met Lys Thr Ser Val
1910 1915 1920

Thr Thr Ser Pro Gln Ser Asp Met Met Arg Glu Gln Leu Gln Leu
1925 1930 1935

Ser Glu Ala Thr Gly Thr Cys Leu Gly Glu Arg Leu Lys His Leu
1940 1945 1950

Glu Arg Leu Ile Arg Ser Ser Arg Glu Glu Glu Val Ala Ser Glu
1955 1960 1965

Leu His Leu Ser Ala Leu Leu Asp Met Val Asp Ile
1970 1975 1980

<210> 5
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 5
ctataaccat ggaccatgga cataacttgt tcc 33

<210> 6
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 6
tgcatgcatt ctagagttgc cgttgggtg ctggac 36

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 7
tcccgccttc cagctgtgac 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 8
gtgctgcgtt gttatgtcct 20

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 9
gccttgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat 30

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 10
ggcaccaaggc atgcacggag tacacaga 28

<210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 11
ggggatccat acccggtgaa ccccctt 26

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 12
gggtcgacgc gcacagactt tccccctga 28

<210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 13
gggaattctc ccgccttcca gctgtgac 28

<210> 14
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 14
gggtcgacgt gctgctgtgt tatgtcct

28

<210> 15
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 15
gggaattcca tgagctgaga ccctcagc

28

<210> 16
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 16
gggtcgactg aggtatgcagg aggccggct

28

<210> 17
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 17
gggaattcta cgttggagag agcctggc

28

<210> 18
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 18
gggtcgacca tgctgtcatc tcctgtga

28

<210> 19
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 19
gggaattcga gaaccctggcc aagggtct

28

<210> 20
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 20
gggtcgacga aaaaccgacg gctgaact

28

<210> 21
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 21
gggaattcaa gcccttccag cctgccct

28

<210> 22
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 22
gggtcgaccg aggaaacgtg gtatttc

28

<210> 23
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 23
ggcccgccgc cgtggatga catcatca

28

<210> 24
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 24
ggctcgagca tgtccaccat ctccagca

28

<210> 25
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 25
gggatccga attccaccat ggcagtctt c aaaccgatac c

41

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 26
gcaggggctc ctccgtatct

20

<210> 27
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 27
ggggatccga attccaccat gtccgagggc ctgggttctt g

41

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 28
ctgtcttgtt tctaagccgc

20

<210> 29
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 29
ggggatccga attccaccat ggagaacctg gccaagggtc t

41

<210> 30
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 30
gaggacttgt agatgtttc accatgg

27

<210> 31
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 31
ggaaattcca ccatggatta caaggatgac gacgataagg cagtcttcaa ccgataacc

58

<210> 32
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 32
gggaattcct ccgggtctcc ctcaagta

28

<210> 33
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 33
gggaattcca ccatggattt caaggatgac gacgataagt ccgagggcct tggttcttg

59

<210> 34
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 34
gggaattcgc tgttttgtt ctaagccg

28

<210> 35
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 35
gggaattcca ccatggatta caaggatgac gacgataagg agaacctggc caagggtct 59

<210> 36
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 36
gggaattctg aggacttgta gatgttt 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14221

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K67/027, C07K16/18, C12P21/08, C12N5/10, A61K39/395//
C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K67/027, C07K16/18, C12P21/08, C12N5/10, A61K39/395//
C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	KUWAHARA K. et al., Germinal center-associated nuclear protein (GANP) has a phosphorylation-dependent DNA-primase activity that is up-regulated in germinal center regions., Proc.Natl. Acad.Sci.USA., 2001, Vol.98, No.18, pages 10279 to 10283	1-5 6-12
Y	SAKAGUCHI N. et al., Involvement of GANP in B cell activation in T cell-dependent antigen response., Dev.Immunol., 2002 September, Vol.9, No.3, p.169-72	1-12
Y	Kiyoshi HABU et al., "Experimental Medicine separate column Shin Idenhi Kogaku Handbook", 1996, pages 269 to 276	1-12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
29 January, 2004 (29.01.04)

Date of mailing of the international search report
10 February, 2004 (10.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14221

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	WO 00/50611 A (KUWAHARA Kazuhiro), 31 August, 2000 (31.08.00), (Family: none)	1-5 6-12
<u>Y</u> A	Mutsu FUJIWARA et al., "GANP Bunshi ni yoru B Saibo Kasseika no Bunshi Kiko", Clinical Immunology, 2002 April, Vol.37, No.4, pages 421 to 425	1-5 6-12
A	JP 2001-78779 A (SUMITOMO ELECTRIC IND. CO.), 27 March, 2001 (27.03.01), (Family: none)	1-12
P,A	KUWAHARA K. et al., Role of GANP in B cell activation, Tanpakushitsu Kakusan Koso., 2002 December, Vol.47 (16 Suppl.), p.2300-5	1-12

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/14221

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int Cl' A01K67/027, C07K16/18, C12P21/08, C12N5/10, A61K39/395 // C12N15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int Cl' A01K67/027, C07K16/18, C12P21/08, C12N5/10, A61K39/395 // C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JST Plus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	Kuwahara K et al., Germinal center-associated nuclear protein (GANP) has a phosphorylation-dependent DNA-primase activity that is up-regulated in germinal center regions., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2001, Vol. 98, No. 18, p. 10279-10283	<u>1 - 5</u> 6 - 12
Y	Sakaguchi N et al, Involvement of GANP in B cell activation in T cell-dependent antigen response., Dev Immunol., 2002 Sep, Vol. 9, No. 3, p. 169-72.	1 - 12

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 01. 2004

国際調査報告の発送日

10. 2. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

六笠 紀子

4 B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	羽生清ら, 実験医学別冊新遺伝子工学ハンドブック, 1996, 第269-276頁	1-12
Y/A	WO 00/50611 A (Kuwahara Kazuhiro) 2000. 08. 31 (ファミリーなし)	<u>1-5</u> 6-12
Y/A	藤村睦ら, GANP分子によるB細胞活性化の分子機構, 臨床免疫, 2002. 4月, 第37巻, 第4号, 第421-425頁	<u>1-5</u> 6-12
A	JP 2001-78779 A (SUMITOMO ELECTRIC IND CO) 2001. 03. 27 (ファミリーなし)	1-12
P, A	Kuwahara K et al, Role of GANP in B cell activation, Tanjakushitsu Kakusan Koso., 2002, Dec., Vol. 47(16 Suppl), p. 2300-5	1-12

Fig. 1

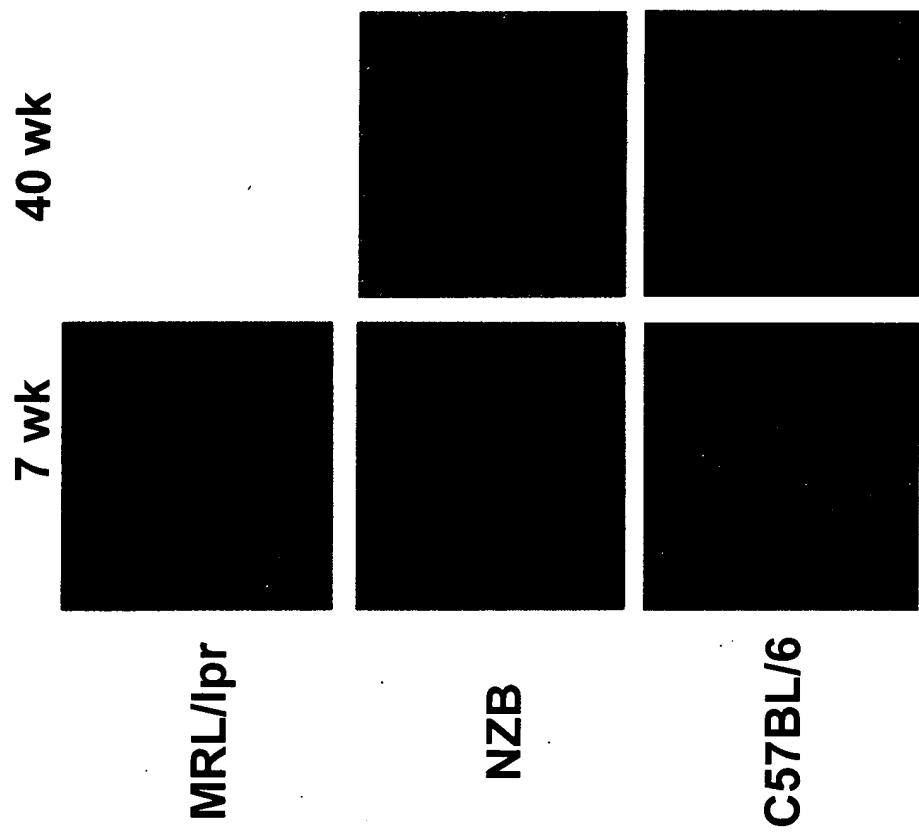


Fig. 2

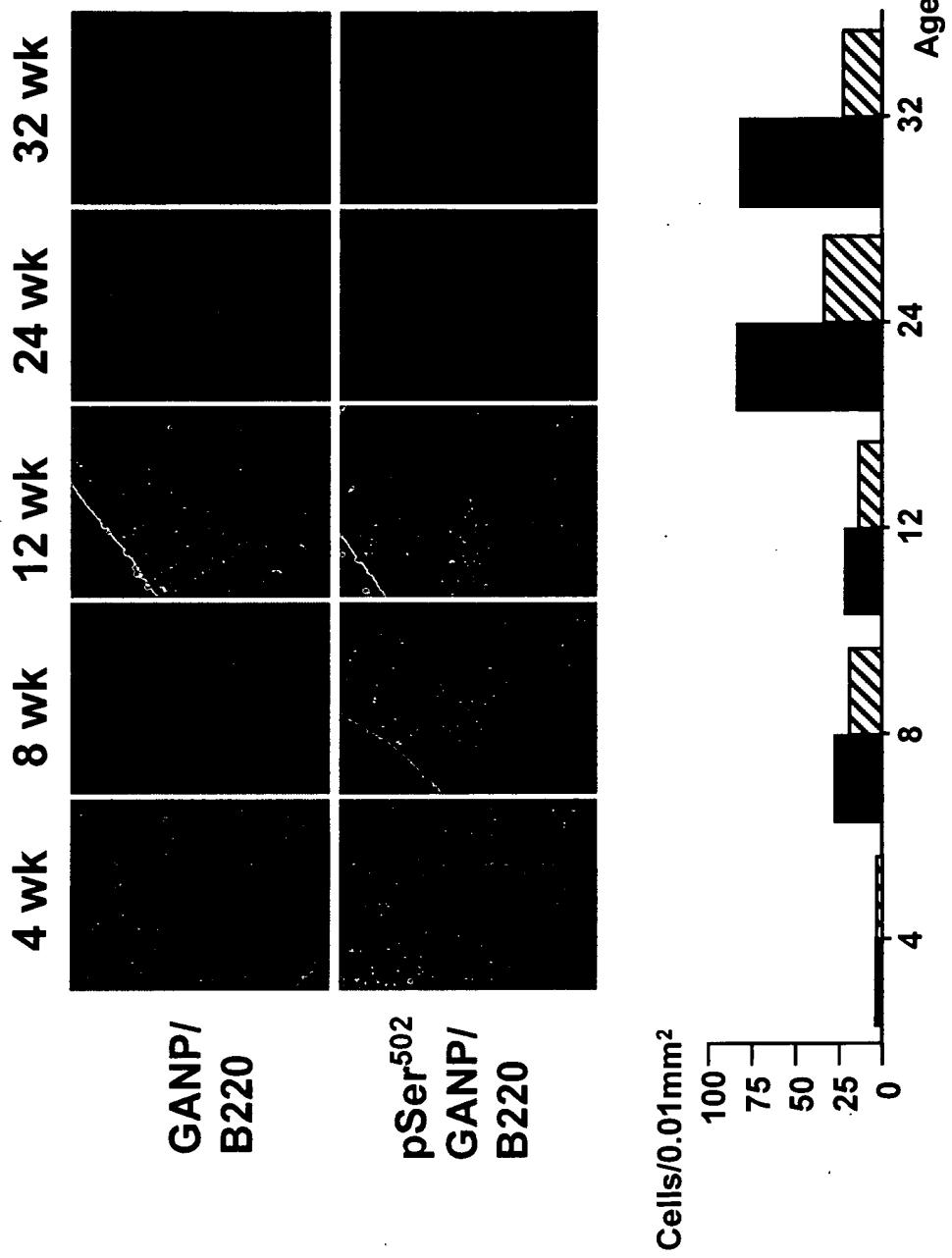


Fig. 3

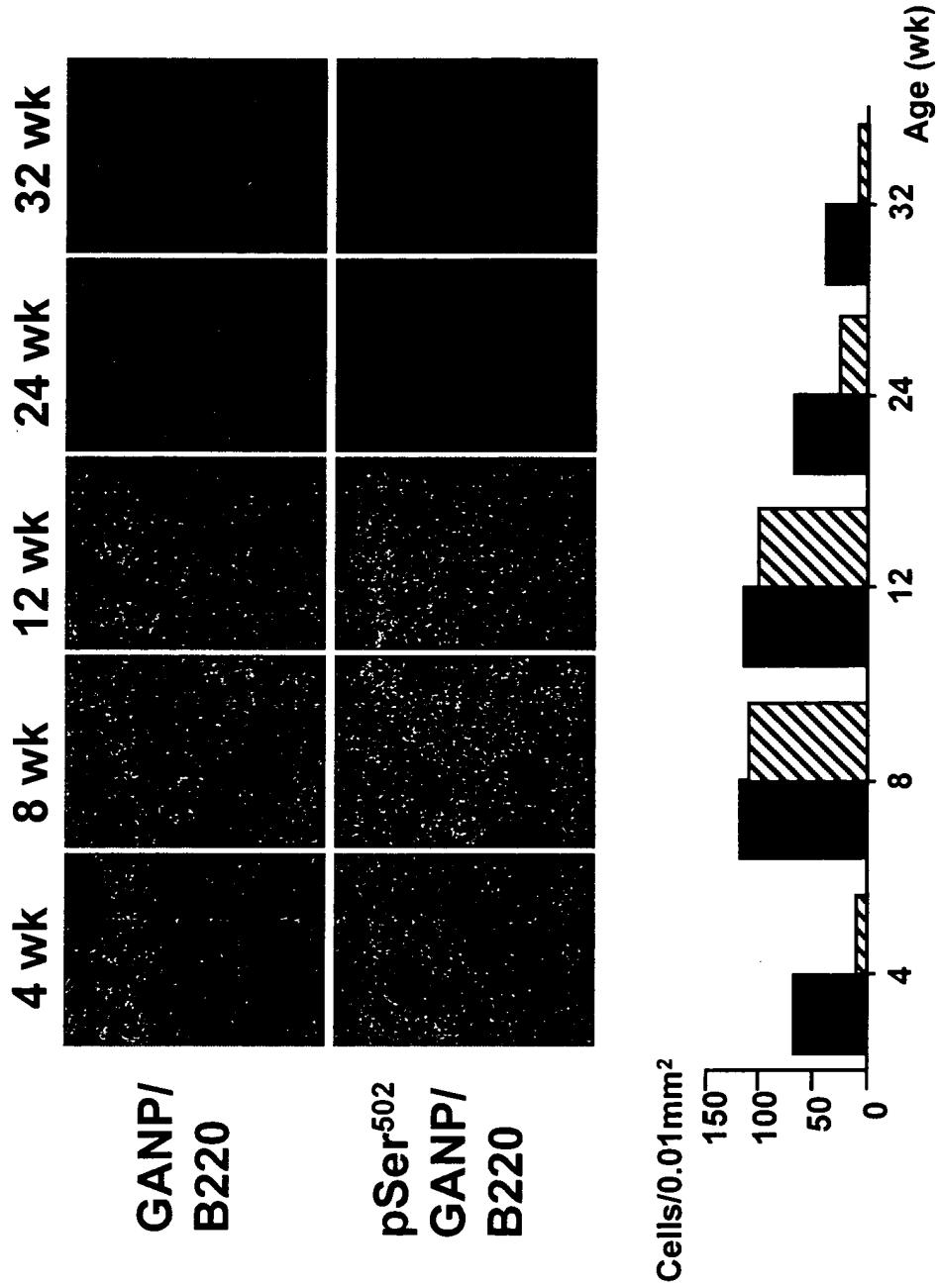


Fig. 4

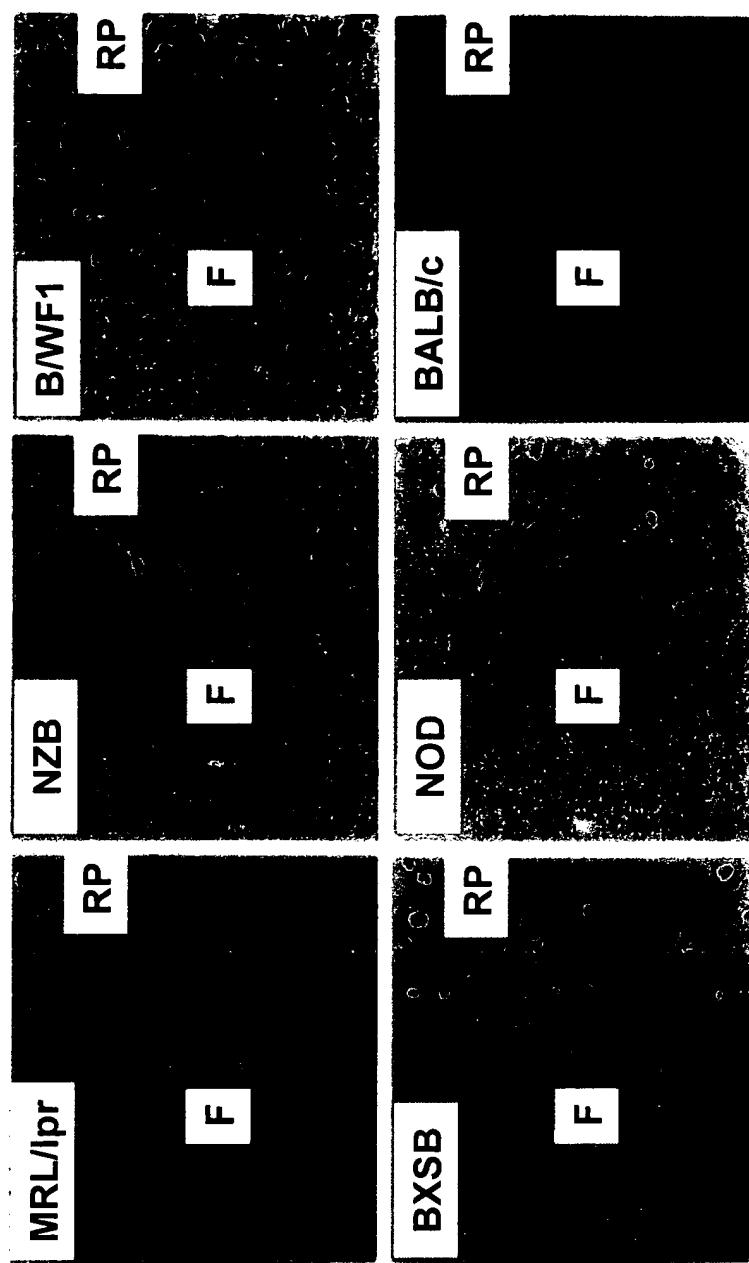


Fig. 5

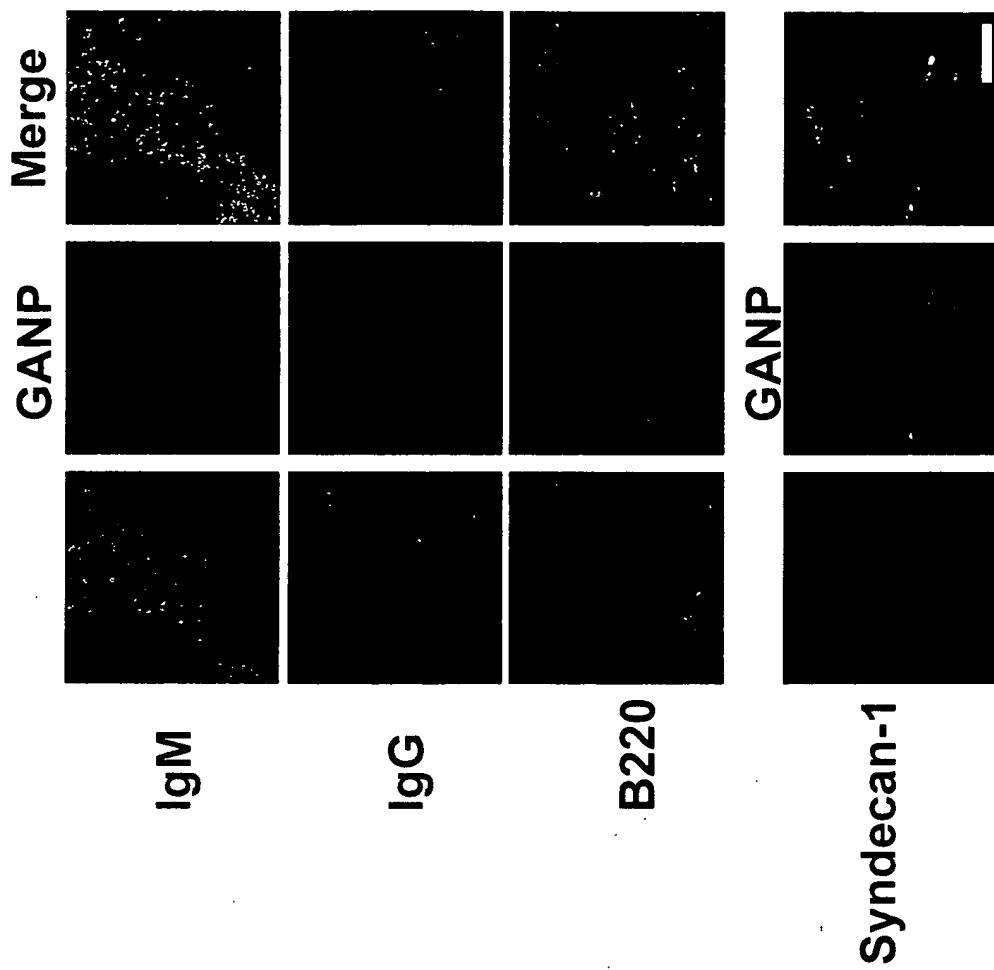


Fig. 6

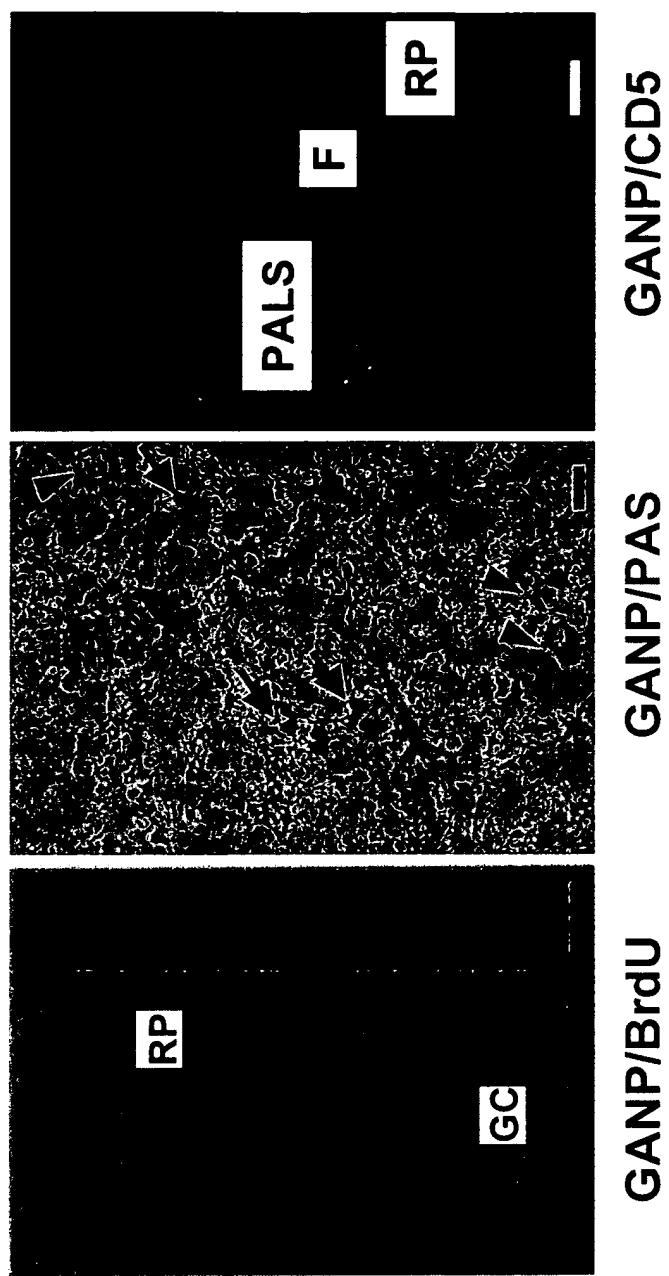


Fig. 7

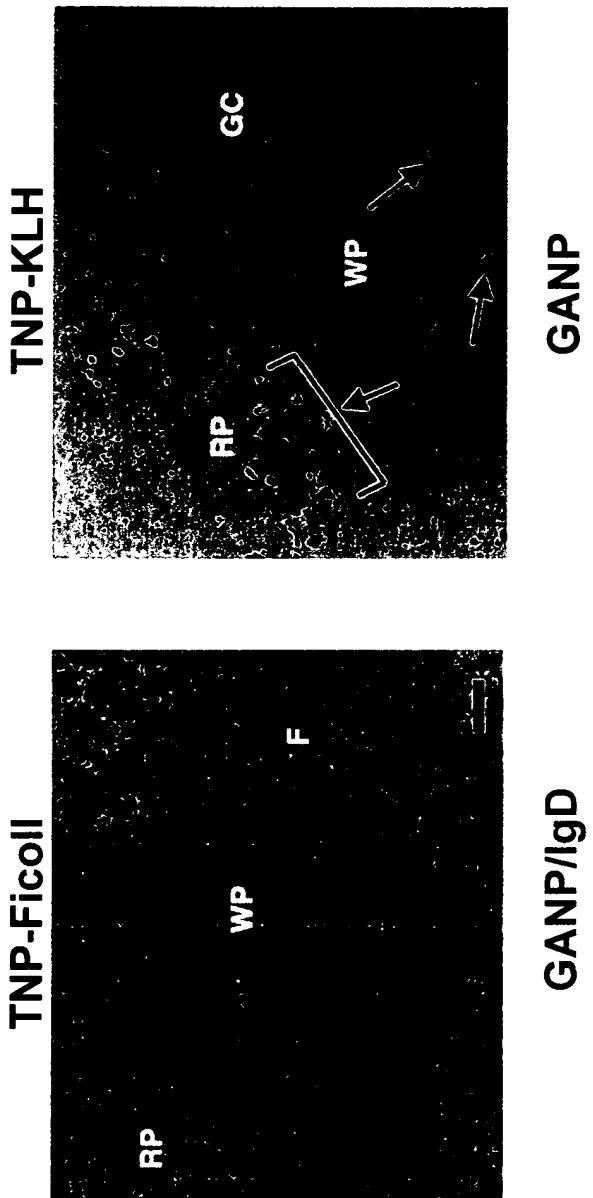


Fig. 8A

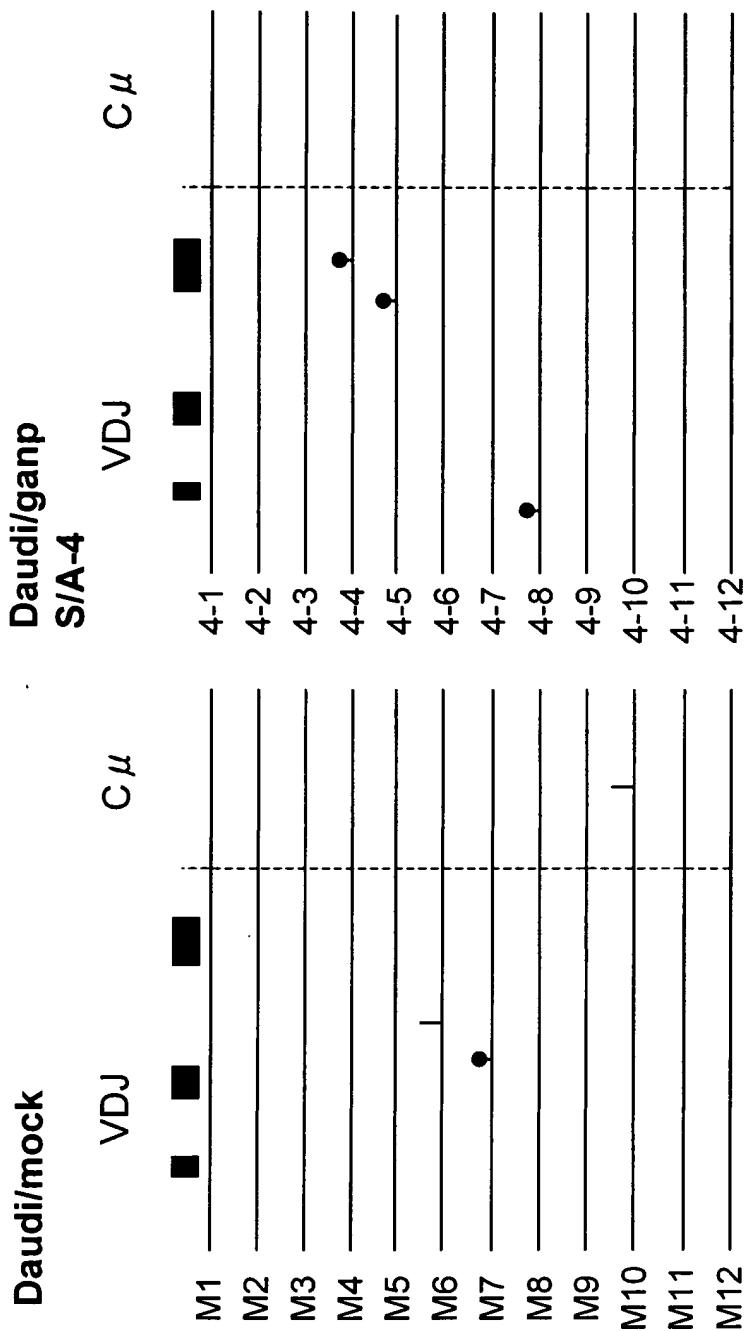


Fig. 8B

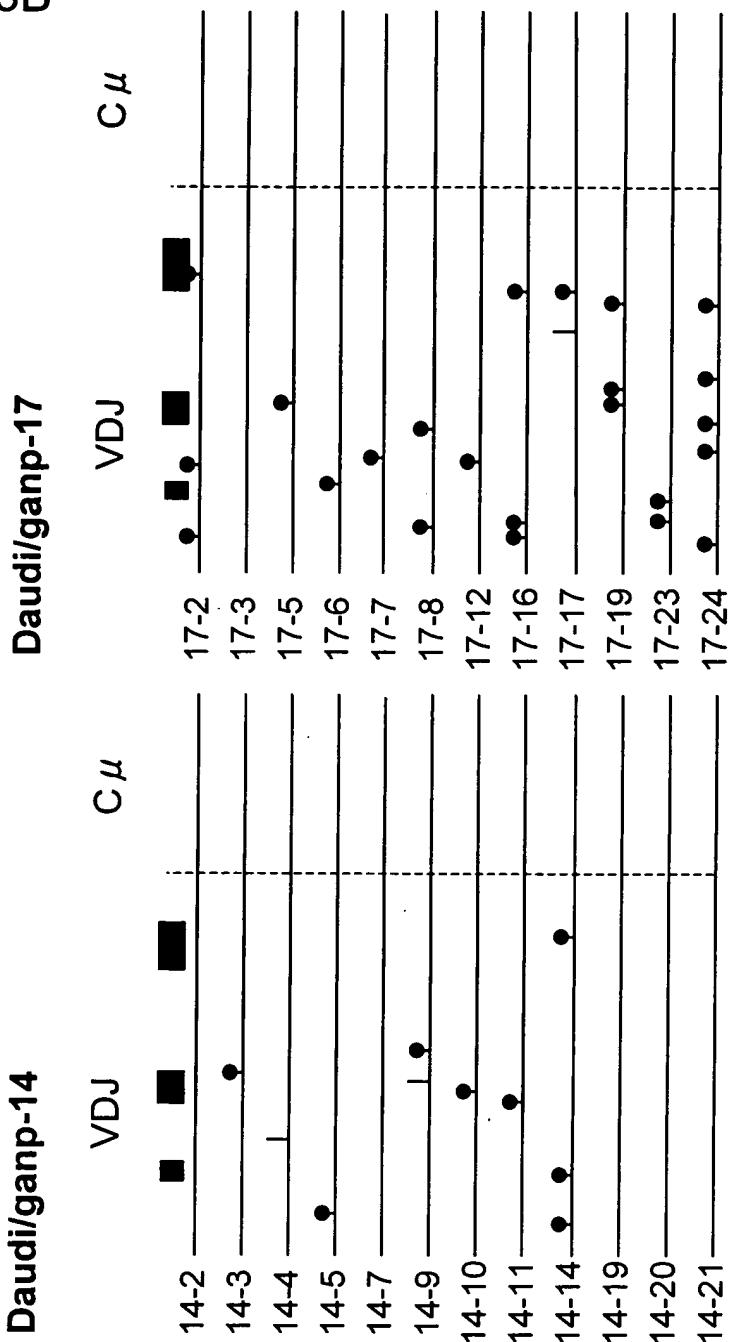


Fig. 8C

Daudi/ganp-15

Daudi/ganp-21

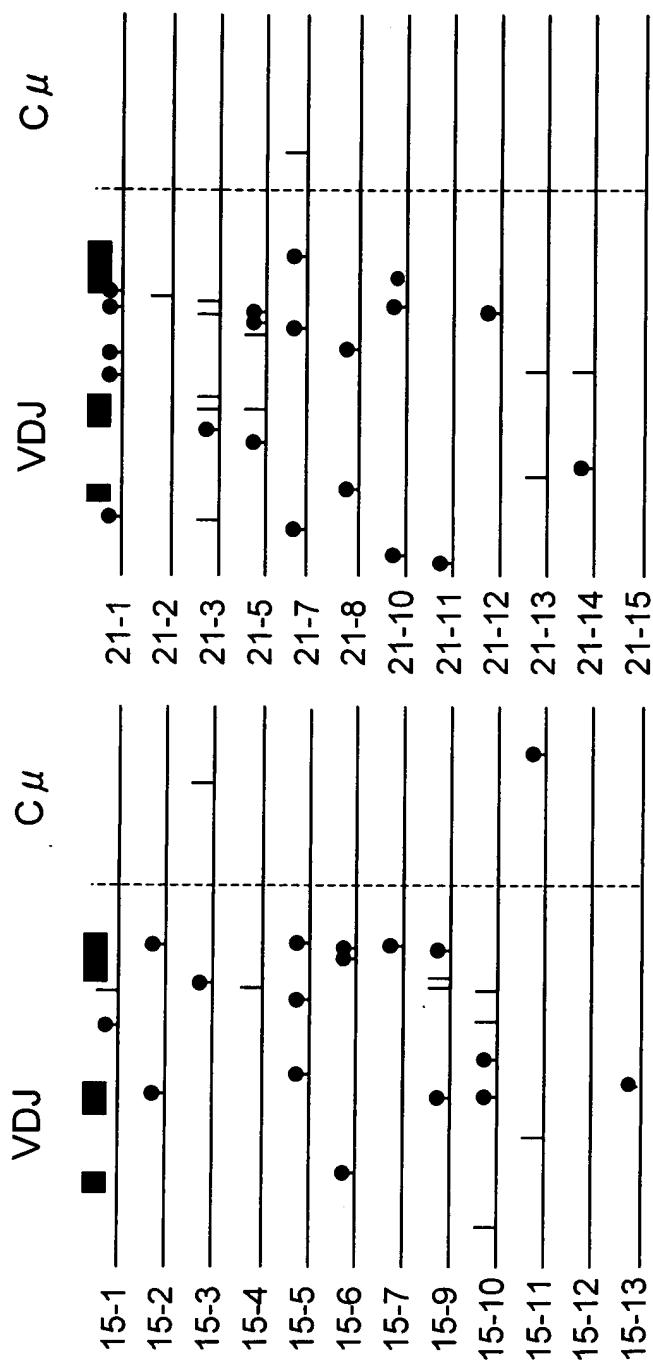


Fig. 9A

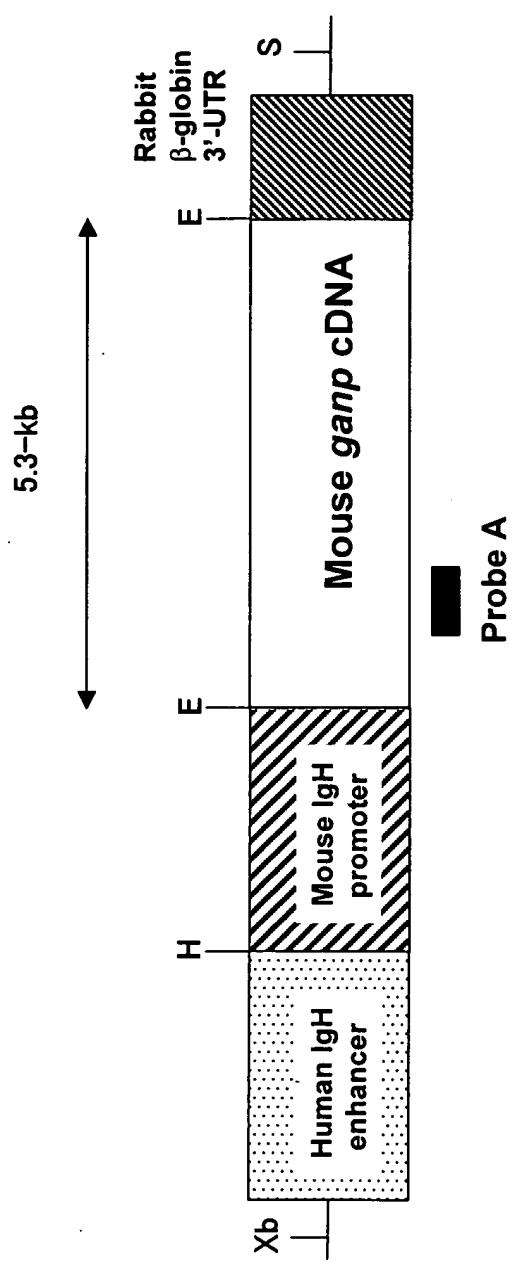


Fig. 9B

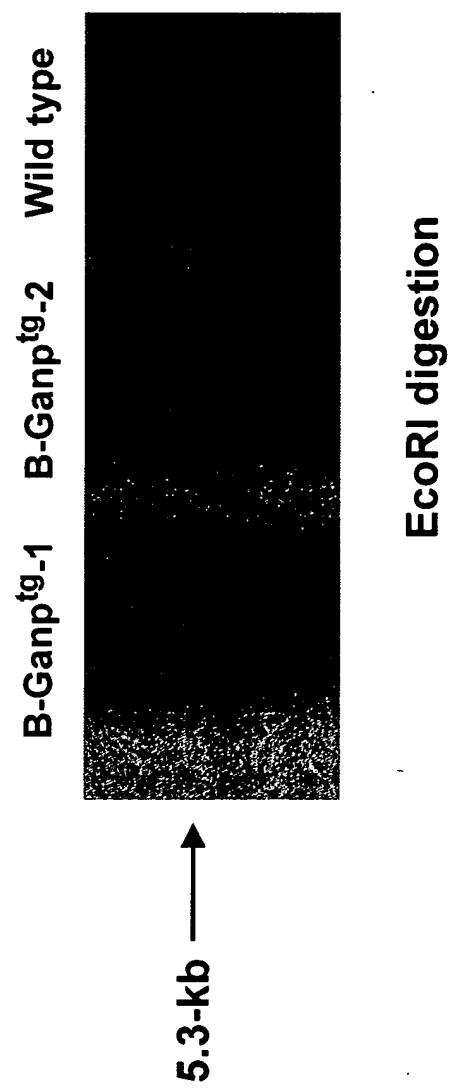


Fig. 9C

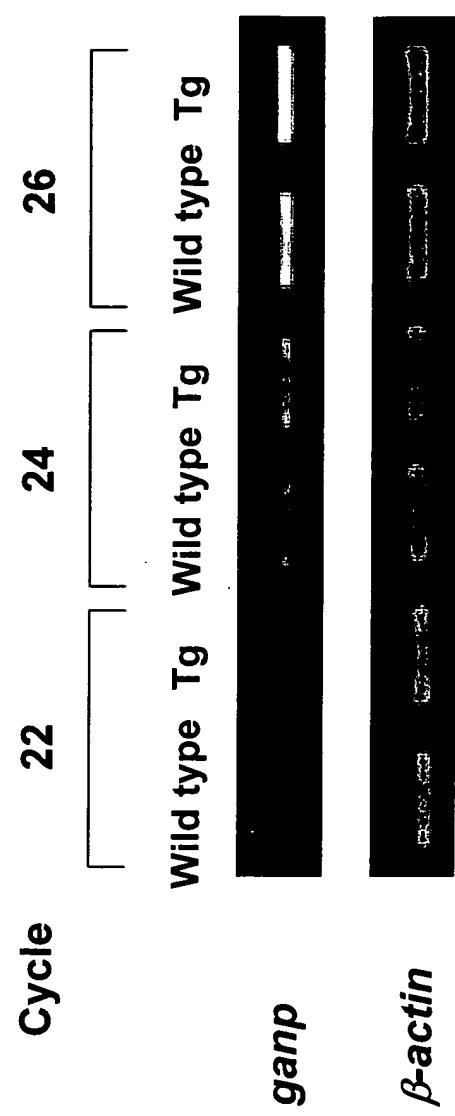


Fig. 10

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Q V L Q P G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F T
CAG GTC CAA CTG CAG CCG CCT AGG GCT GAG CCR GGG CCT TCA GTG AGG CTC TGC AGG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC
WT-4 ---
WT-5 ---
WT-6 ---
WT-9 ---
WT-10 ---
WT-11 ---
WT-14 ---
WT-16 ---
WT-17 ---
WT-18 ---
WT-19 ---
WT-20 ---
WT-21 ---
WT-22 ---

CDR1

CDR2

Fig. 10 continued 1

Fig. 10 continued 2

Fig. 10 continued 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Q	V	Q	L	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	
CAG	GTC	CAA	CTG	CAG	CGG	CCT	GGG	GCT	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA	GTG	AAG	CTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	TTC	ACC		
Tg-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tg-23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tg

Fig. 10 continued 4

Fig. 10 continued 5

Fig. 11A

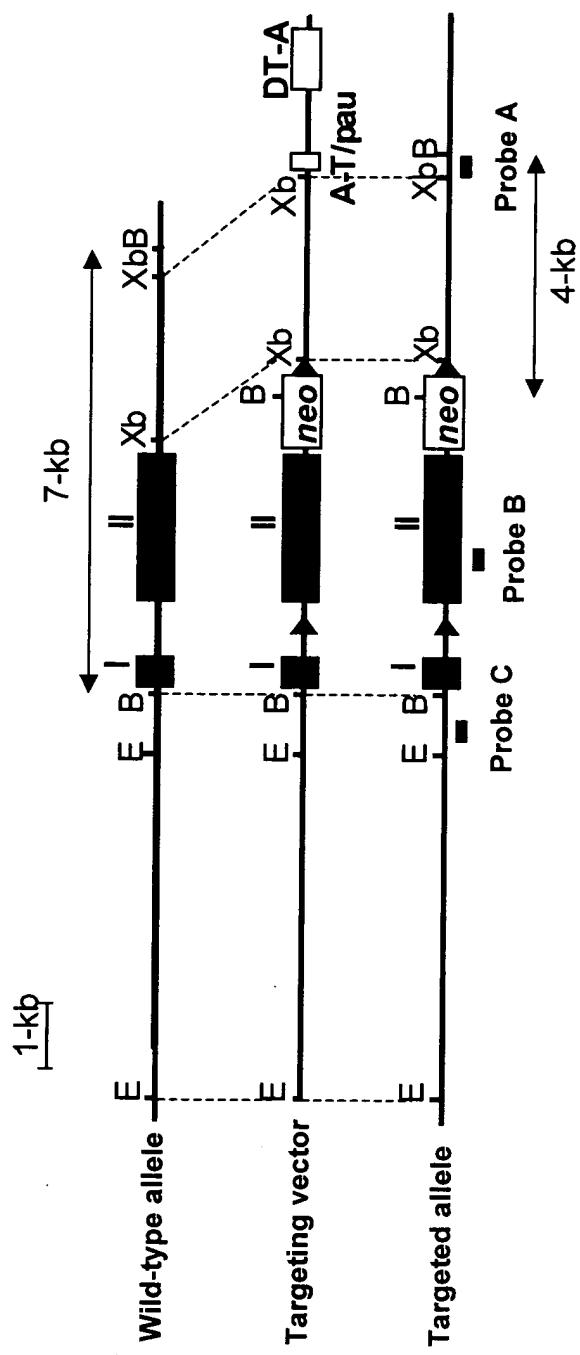


Fig. 11B

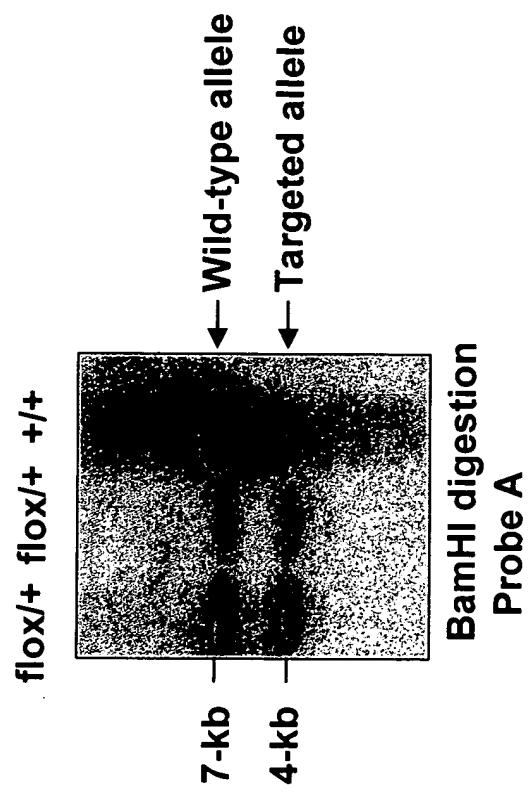


Fig. 11C

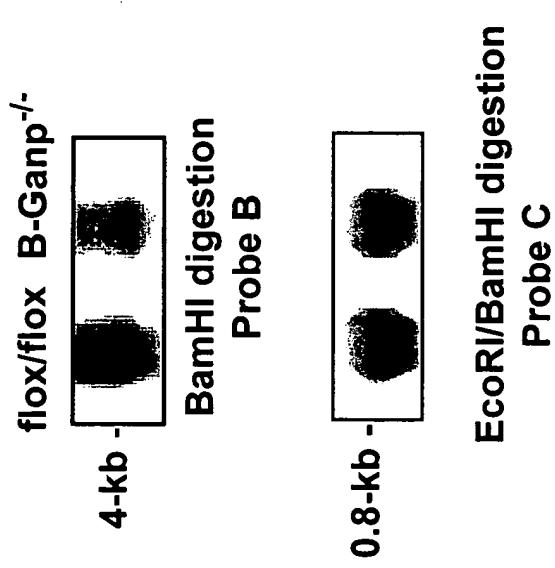


Fig. 11D



10/534043

Fig. 11E

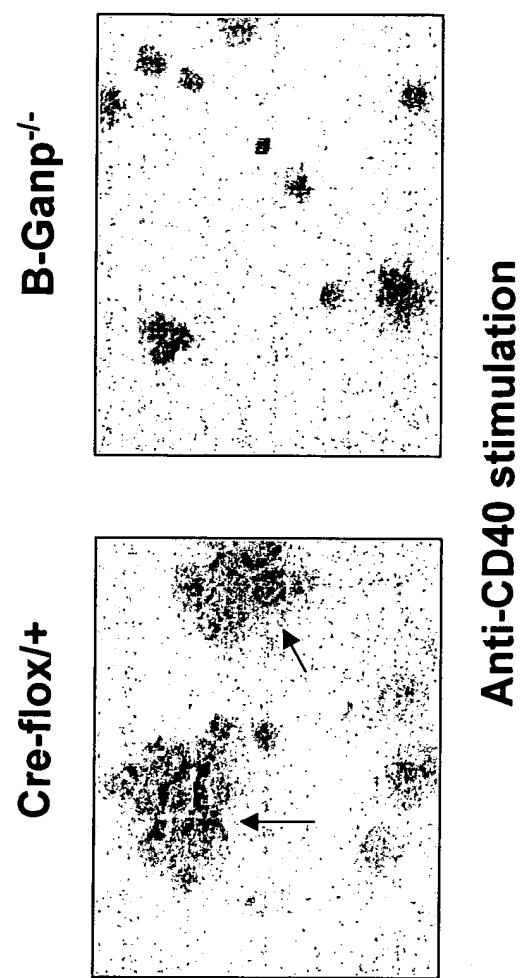


Fig. 12

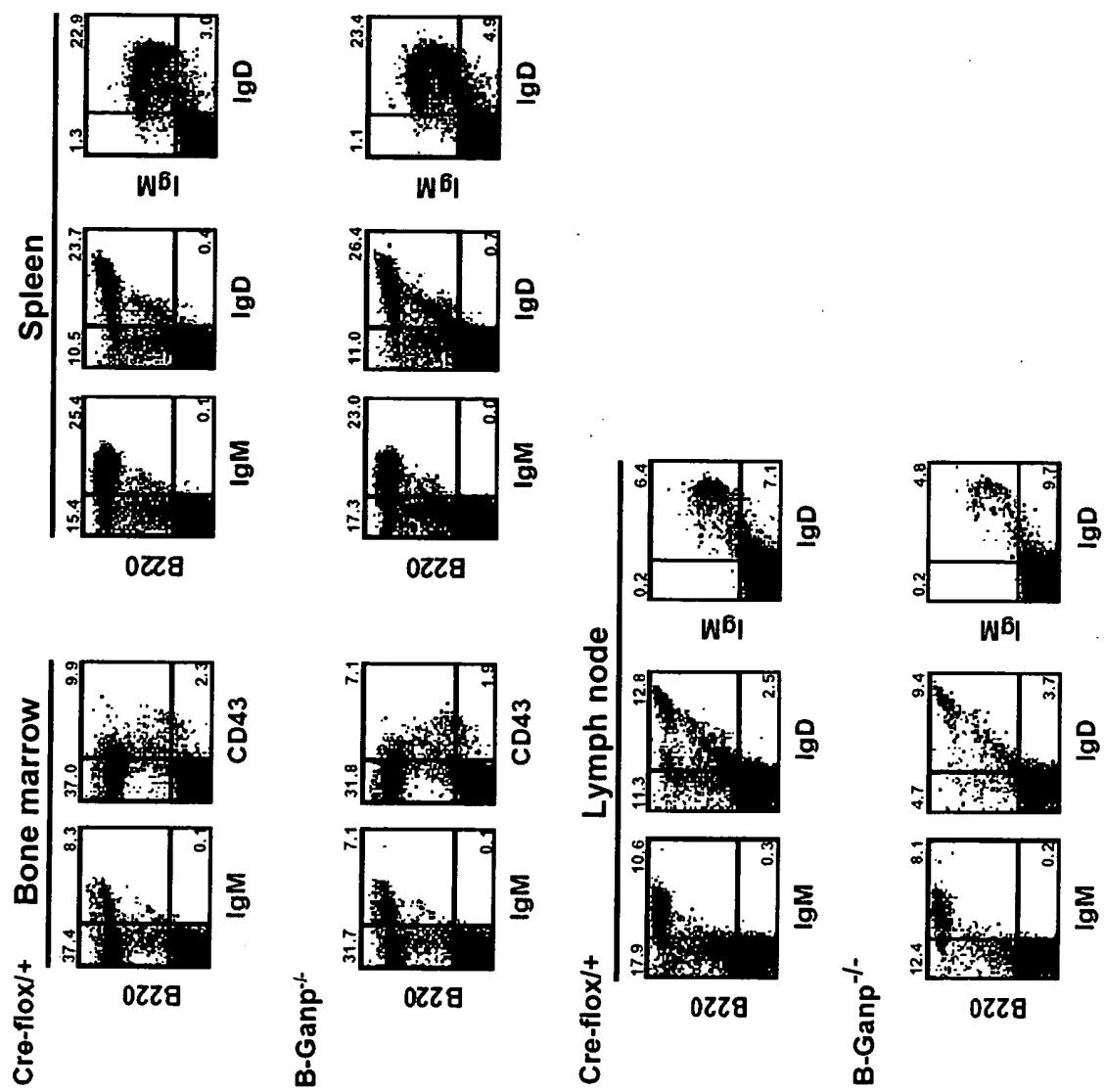
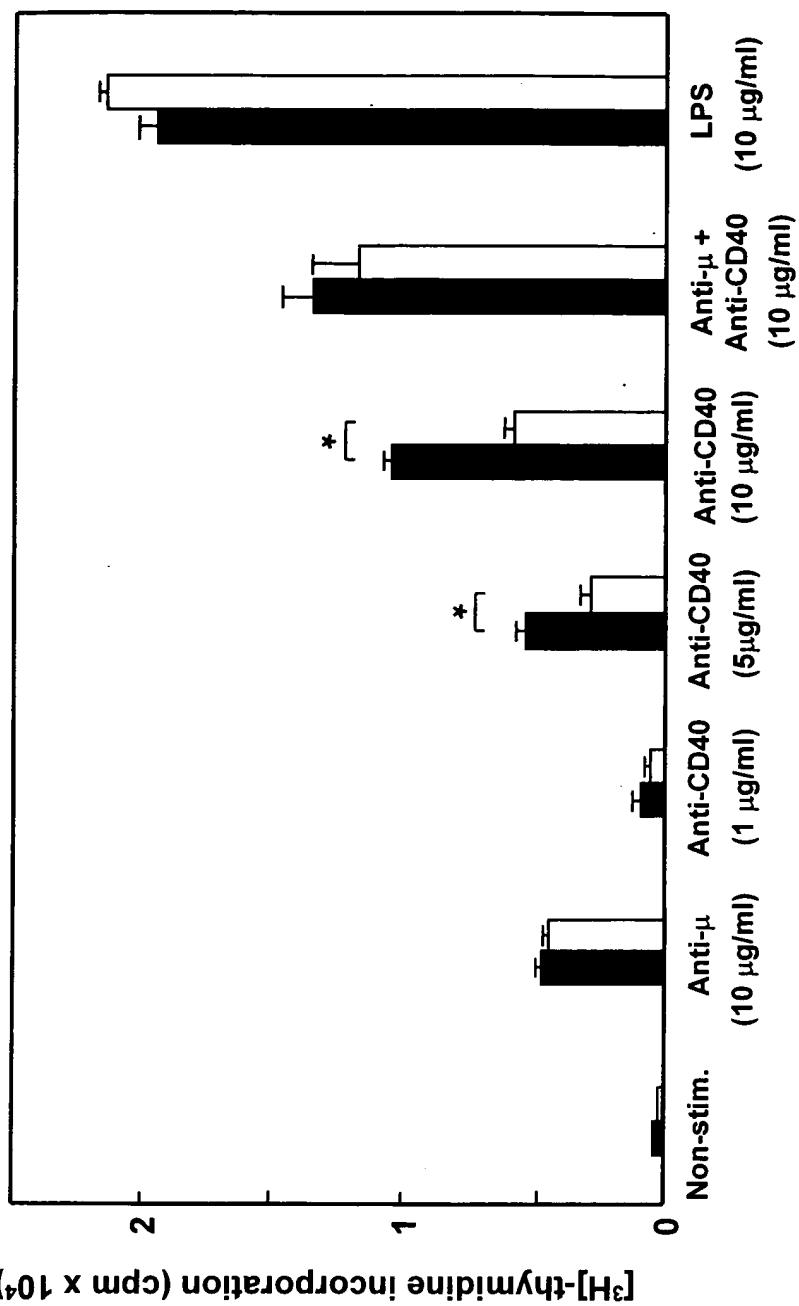


Fig. 13



10/534043

Fig. 14

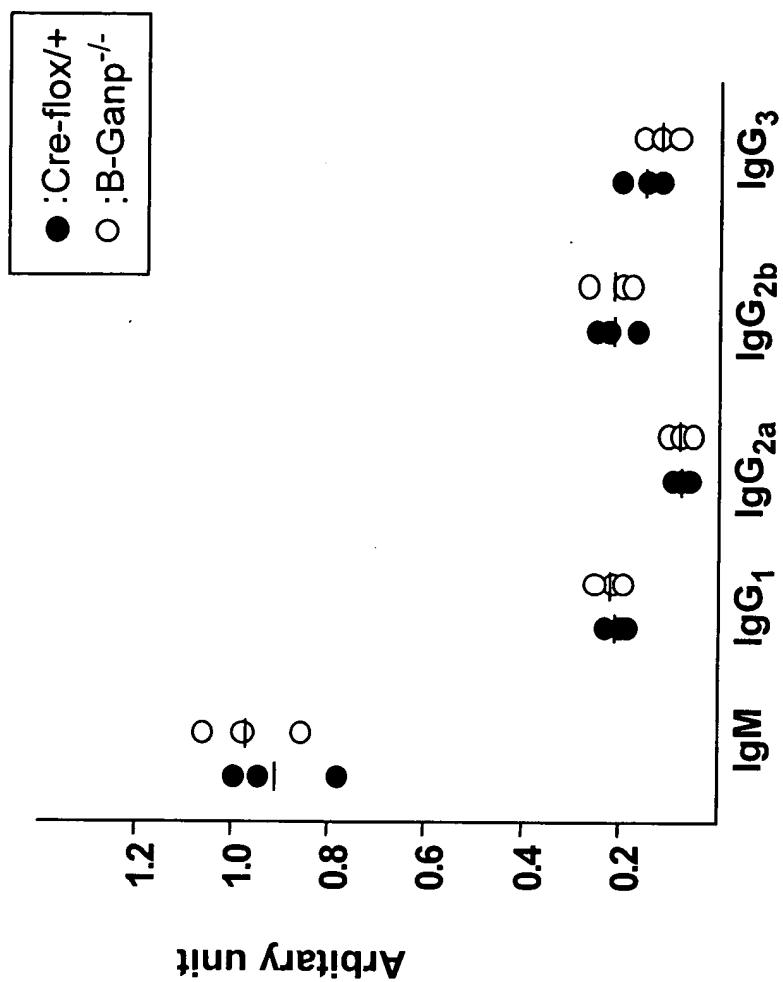


Fig. 15

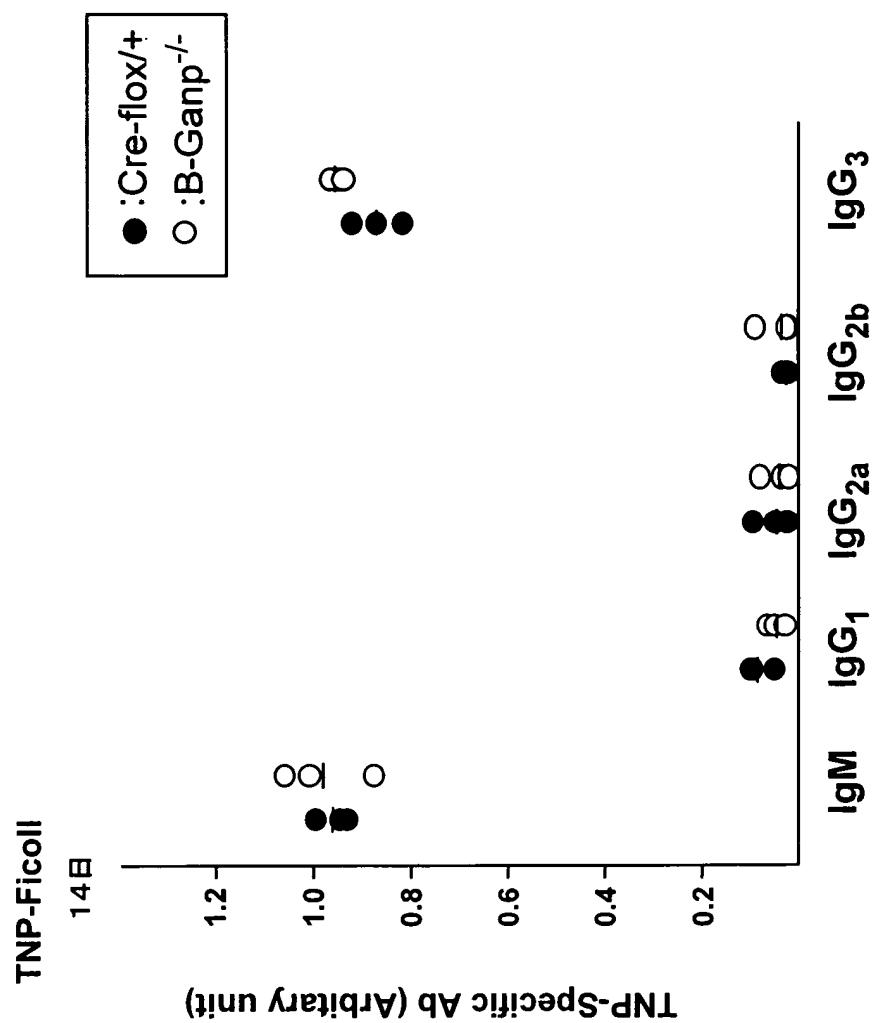


Fig. 16

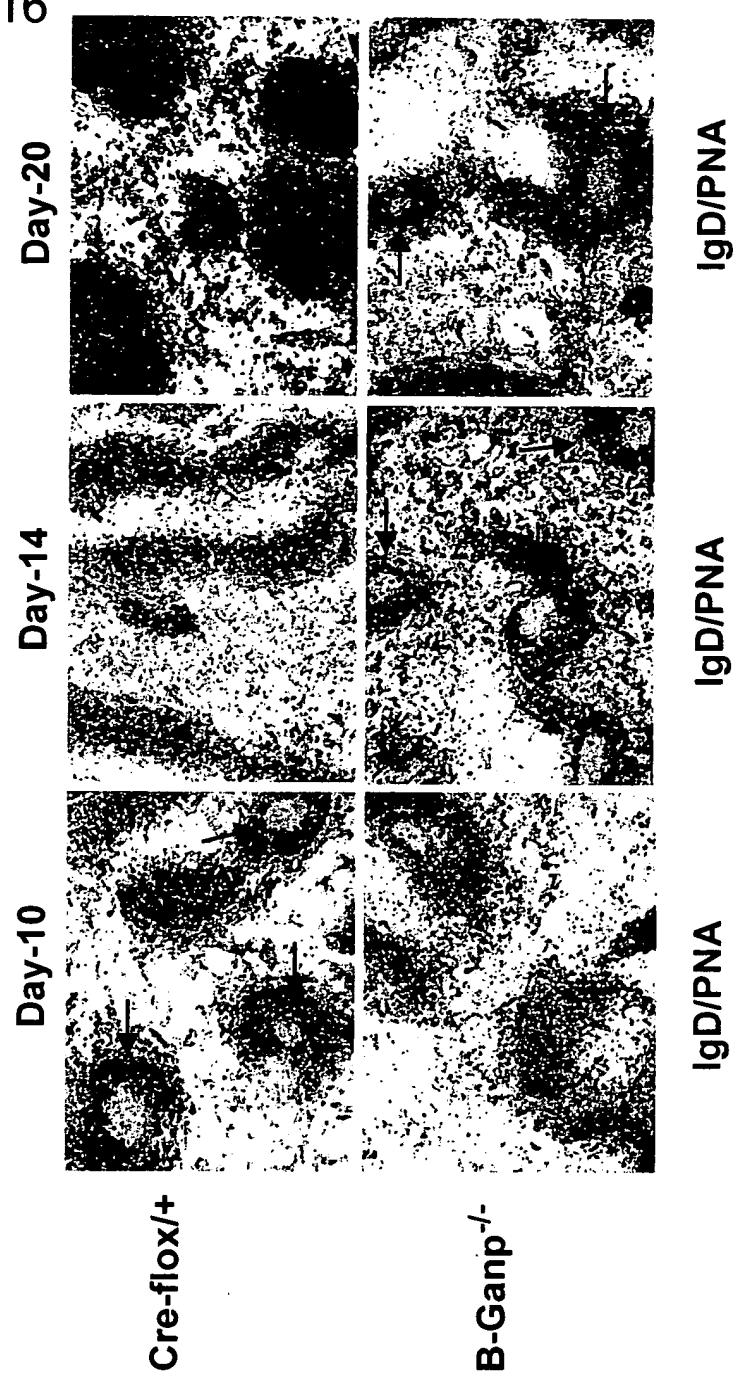


Fig. 17

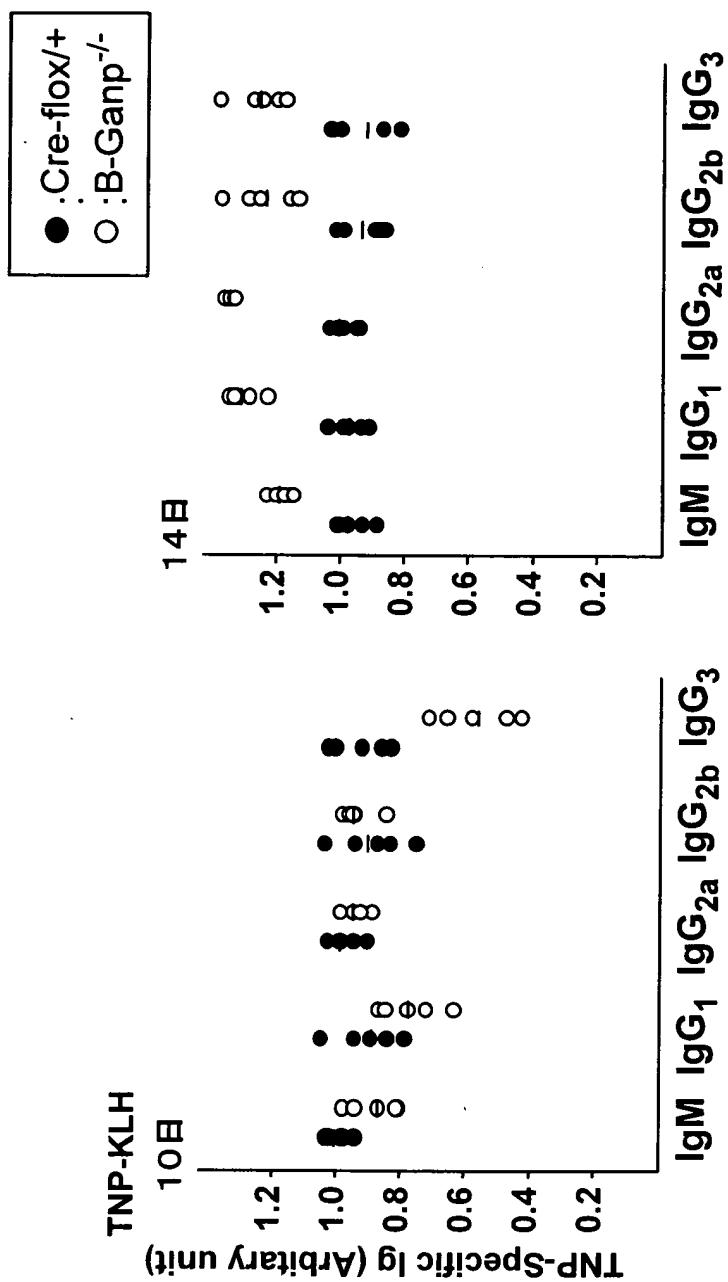


Fig. 18

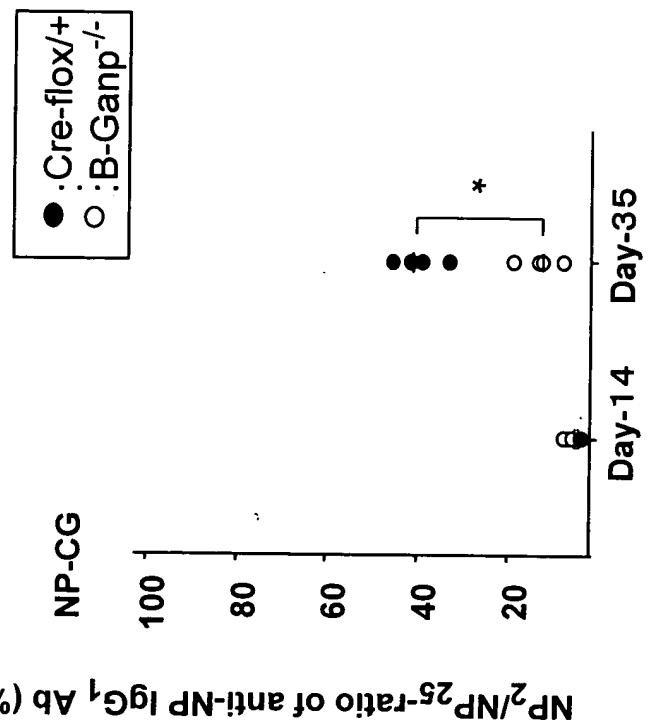


Fig. 19

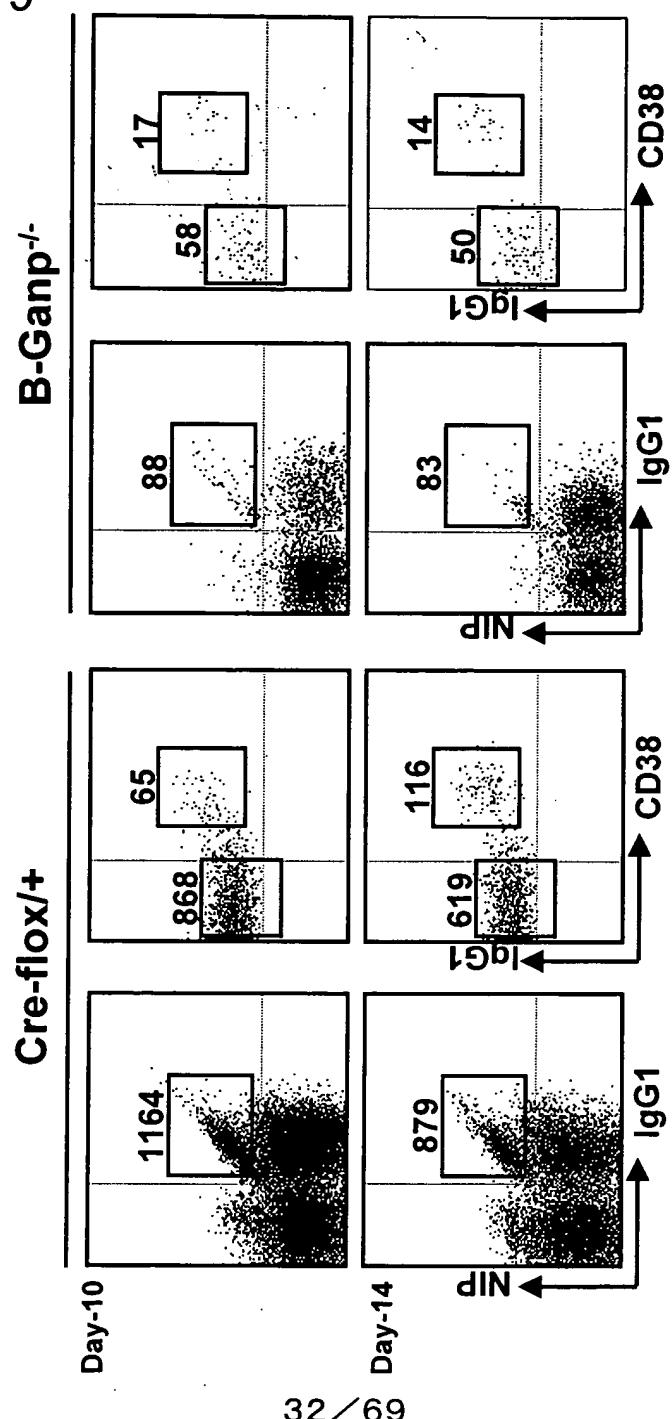


Fig. 20A

Cre-flox/+

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S
CAG	GTC	CAA	CTG	CAG	CAG	CCT	GGG	GCT	GAG	CTT	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA

1-5 -----

1-6 ----- A -----

3-1 ----- R -----

3-2 ----- G -----

3-3 ----- G -----

4-2 ----- G -----

4-3 ----- G -----

4-4 ----- G -----

4-6 -----

1-8 -----

1-10 ----- G -----

4-7 ----- G -----

6-1 ----- T A -----

6-2 ----- A G -----

7-1 -----

Fig. 20B

Cre-flox/+

18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H
GTG	AAG	CTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	TTC	ACC	AGC	TAC	TGG	ATG	CAC
I								A									
---	-TT	---	---	---	---	---	---	-C-	---	---	-T	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	R	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	A	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	L	I	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-C-	-T	-T	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	I	*					
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A	-TT	-G	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L	T	L	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	C	TA	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L	T	L	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	-C	TA	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L	T	L	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	-C	TA	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	L		---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	-T	A	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T	L		---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	-T	T	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	L	T	L	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	-C	TA	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	F	L		---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	T		T	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	V		L	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G		T	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		N	L	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		A	T	---	---	---	---

Fig. 20C

Cre-flox/+

36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
W	V	K	Q	R	P	G	R	G	L	E	W	I	G
TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GGA	CGA	GGC	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA

Fig. 20D

Cre-flox/+

50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
R	I	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	K
AGG	ATT	GAT	CCT	AAT	AGT	GGT	GGT	ACT	AAG	TAC	AAT	GAG	AAG	TTC	AAG	AGC	AAG
1-5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1-6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3-1	---	---	---	---	---	-A-	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
				M				S	R				Y				
3-2	---	---	---	-TG	---	-C-	-G-	-G-	---	---	---	T-C	---	---	---	---	---
3-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4-6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1-8	---	---	---	-A-	---	---	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---
	V				T							S					
1-10	G	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4-7	---	---	---	---	-A-	---	---	---	---	---	---	D	---	---	---	---	---
6-1	---	---	---	---	---	---	---	---	-C-	---	-A-	---	T	---	N	---	---
6-2	---	---	---	---	---	-S-	---	---	---	---	---	T	---	C	---	---	---
7-1	---	---	---	---	---	A	---	---	---	---	---	T	---	N	---	-A-	---
												-C-	---	-A-	---		

Fig. 20E

Cre-flox/+

68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
A	T	L	T	V	D	K	P	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S
GCC	ACA	CTG	ACT	GTA	GAC	AAA	CCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	AGC

----- T -----
I
----- A -----
I
----- A -----
I
----- A -----
Q C ----- F T -----
e .
N
A
----- T -----

Fig. 20F

Cre-flox/+

85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R
AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAT	TGT	GCA	AGA

T D
A— — — G—

G

G

6

Fig. 20G

B-Gap^{-/-}

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S
CAG	GTC	CAA	CTG	CAG	CAG	CCT	GGG	GCT	GAG	CTT	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA

1-1 -----

1-5 -----

1-6 -----

2-2 -----

2-3 -----

T

4-3 ----- A -- A -- G -----

4-4 -----

6-1 -----

6-2 -----

7-1 -----

8-1 -----

8-2 -----

9-1 -----

9-3 -----

9-4 -----

Fig. 20H

B-Gap^{-/-}

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35
V K L S C K A S G Y T F T S Y W M H
GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC

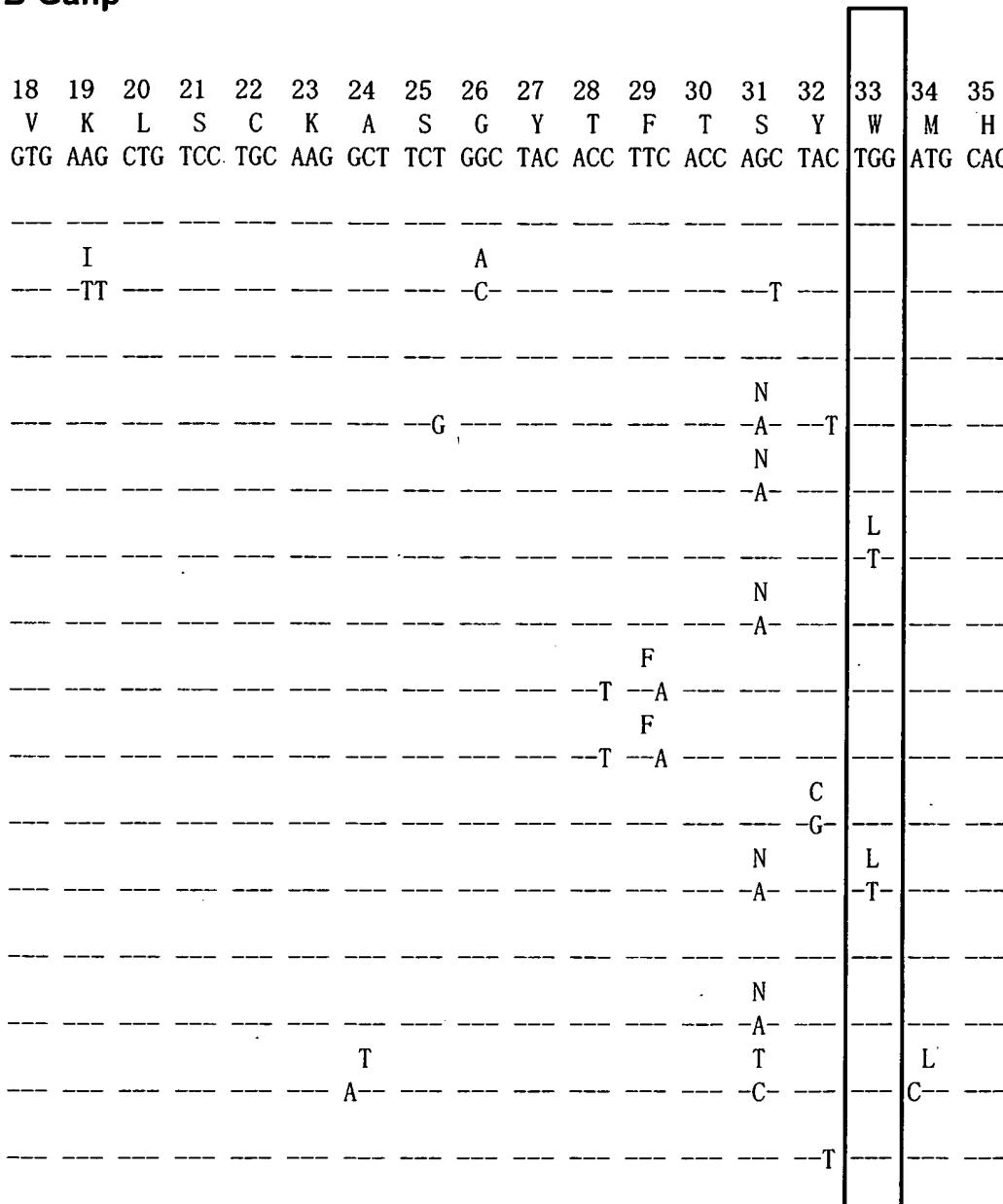


Fig. 20 I

B-Ganp^{-/-}

36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
W	V	K	Q	R	P	G	R	G	L	E	W	I	G
TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GGA	CGA	GGC	CTT	GAG	TGG	ATT	GGAA

101534043

Fig. 20J

B-Ganp^{-/-}

10/534043

Fig. 20K

B-Gap^{-/-}

66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82
S K A T L T V D K P S S T A Y M Q
AGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA CCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG

--T-----

-----A

A

-----C-----

N

-----A-----G-----

S

-----T-----

T

-----C-----

-----T-----A

T

S

-----T-----

Fig. 20L

B-Gap^{-/-}

83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98
L S S L T S E D S A V Y Y C A R
CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAT TGT GCA AGA

-----C-----

-----C-----

-----C-----

-----C-----

-----F-----
T-----

Fig. 21

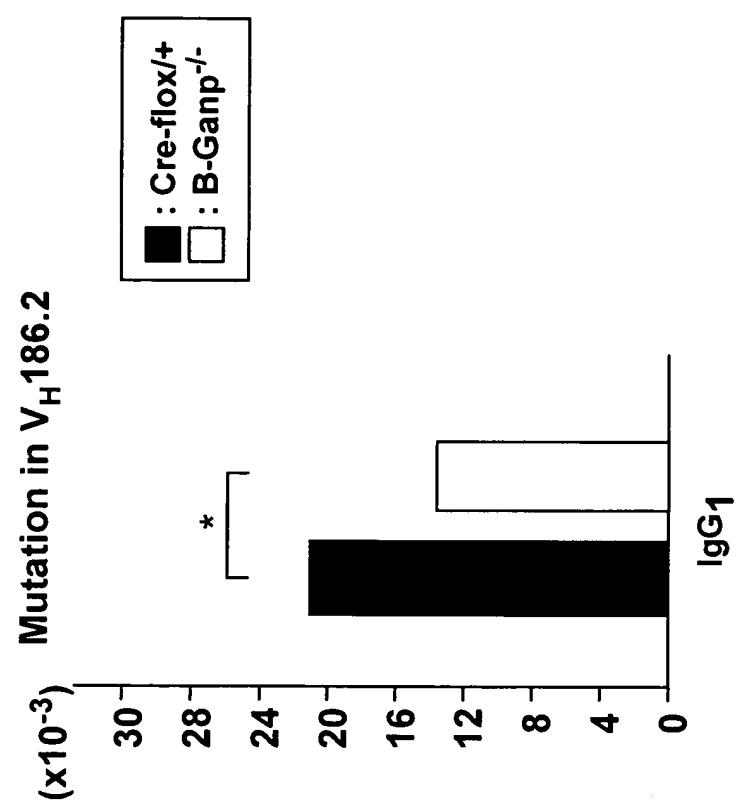


Fig. 22

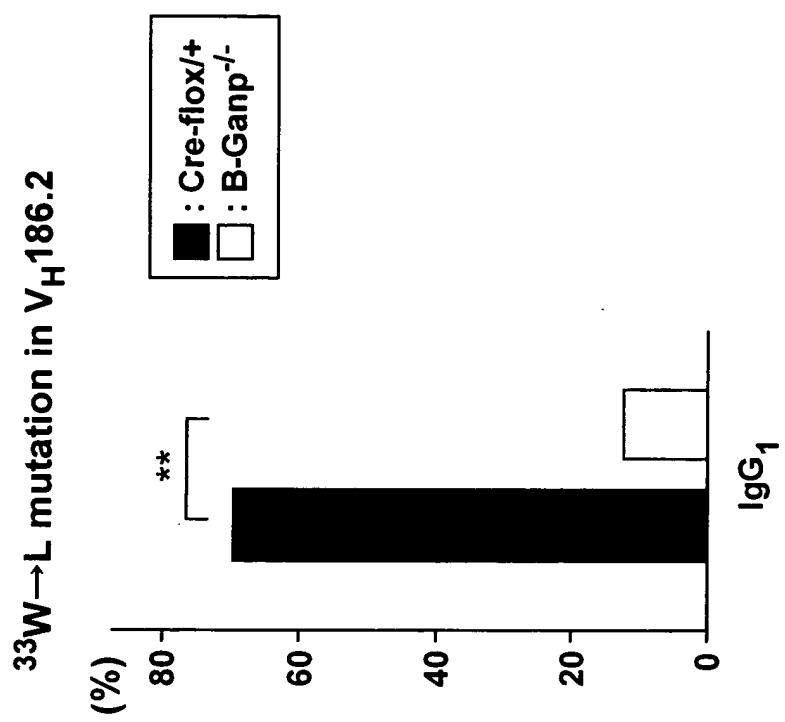


Fig. 23

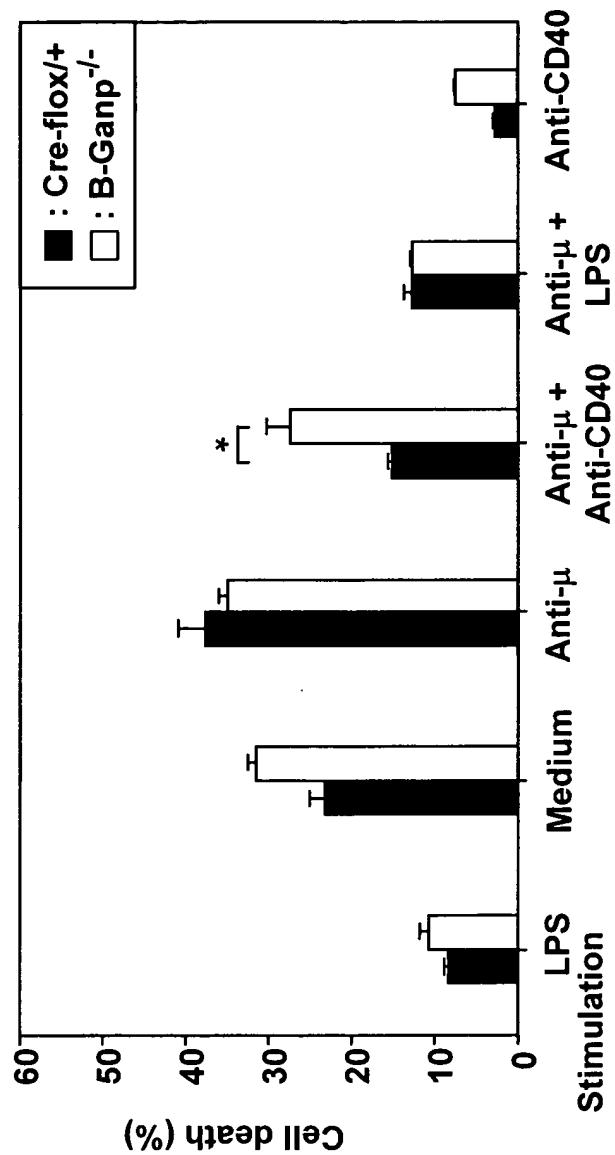


Fig. 24

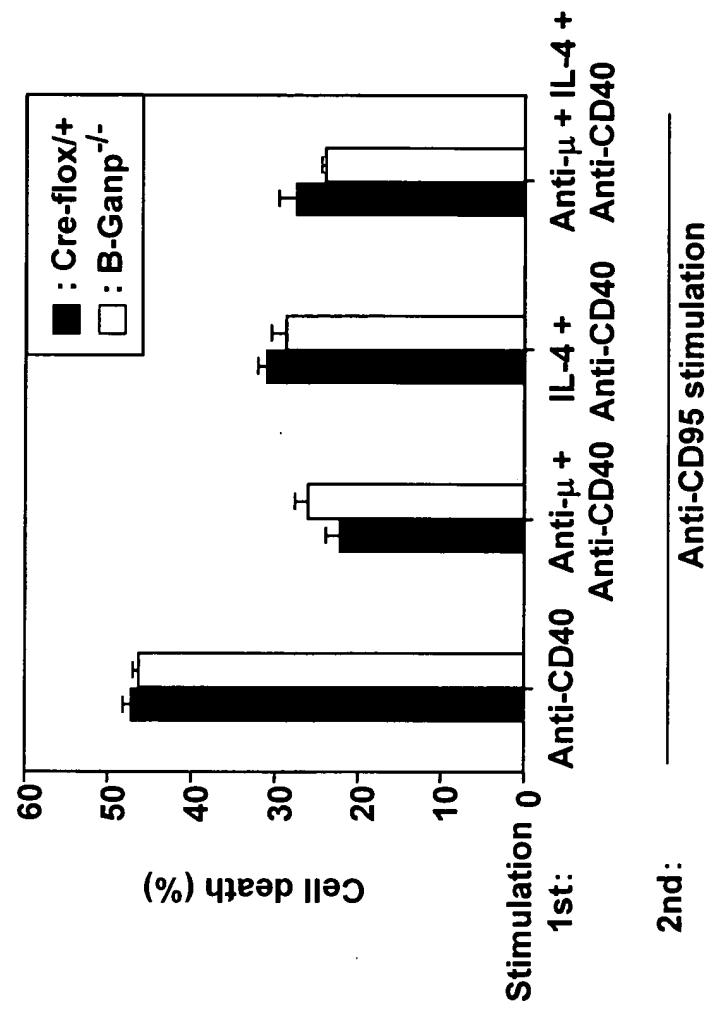
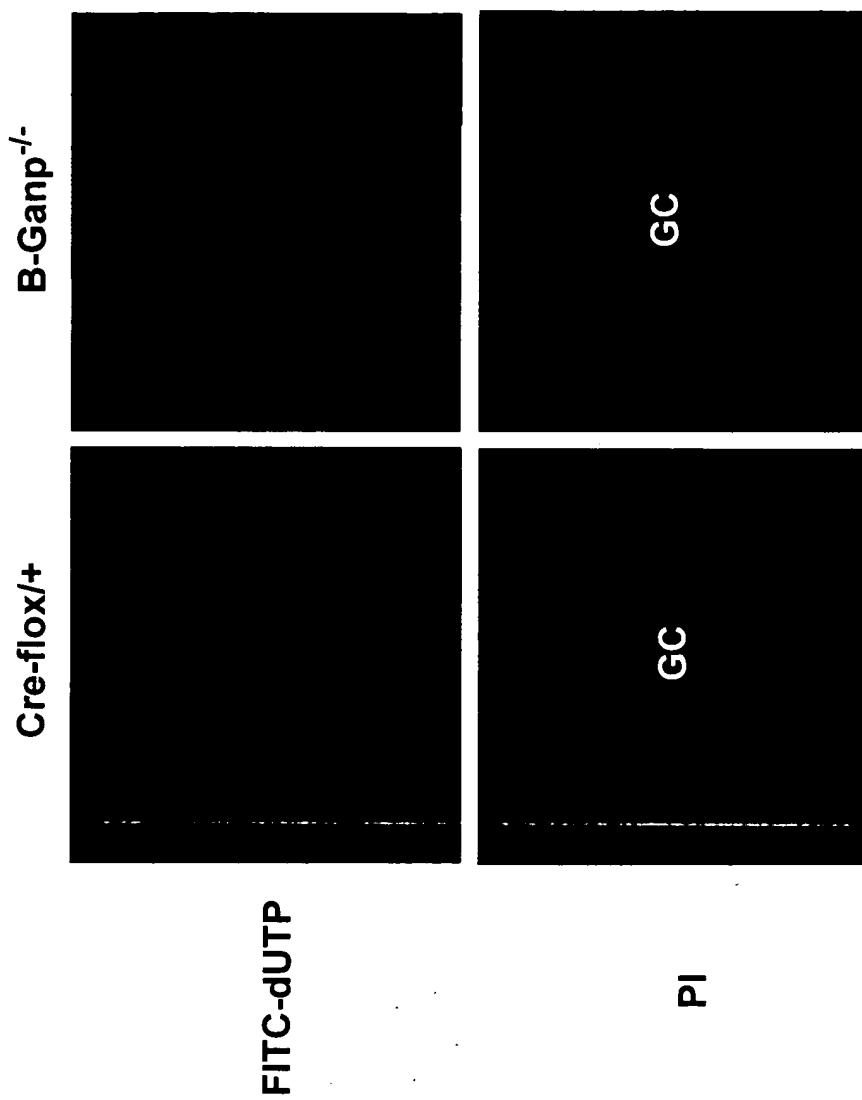


Fig. 25



49/69

Fig. 26

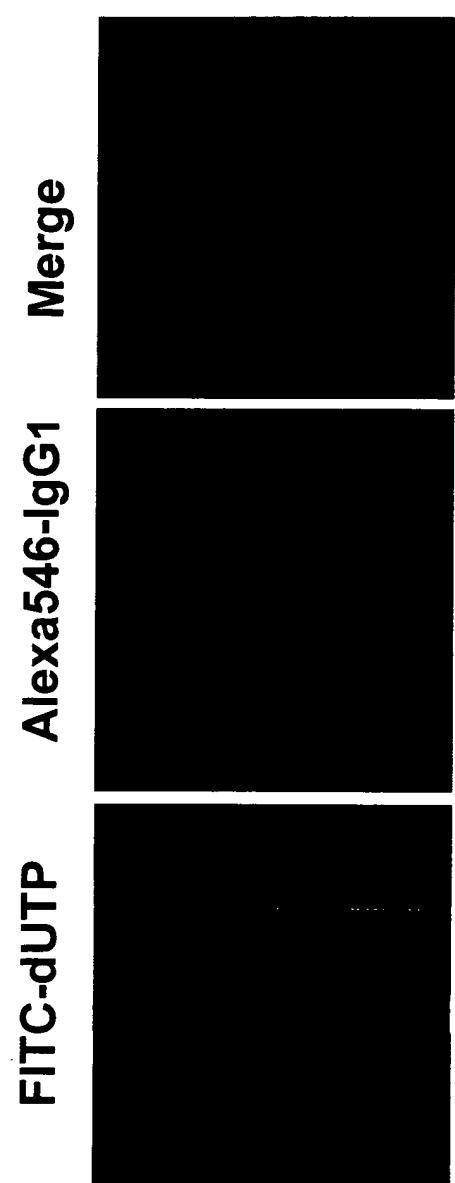


Fig. 27

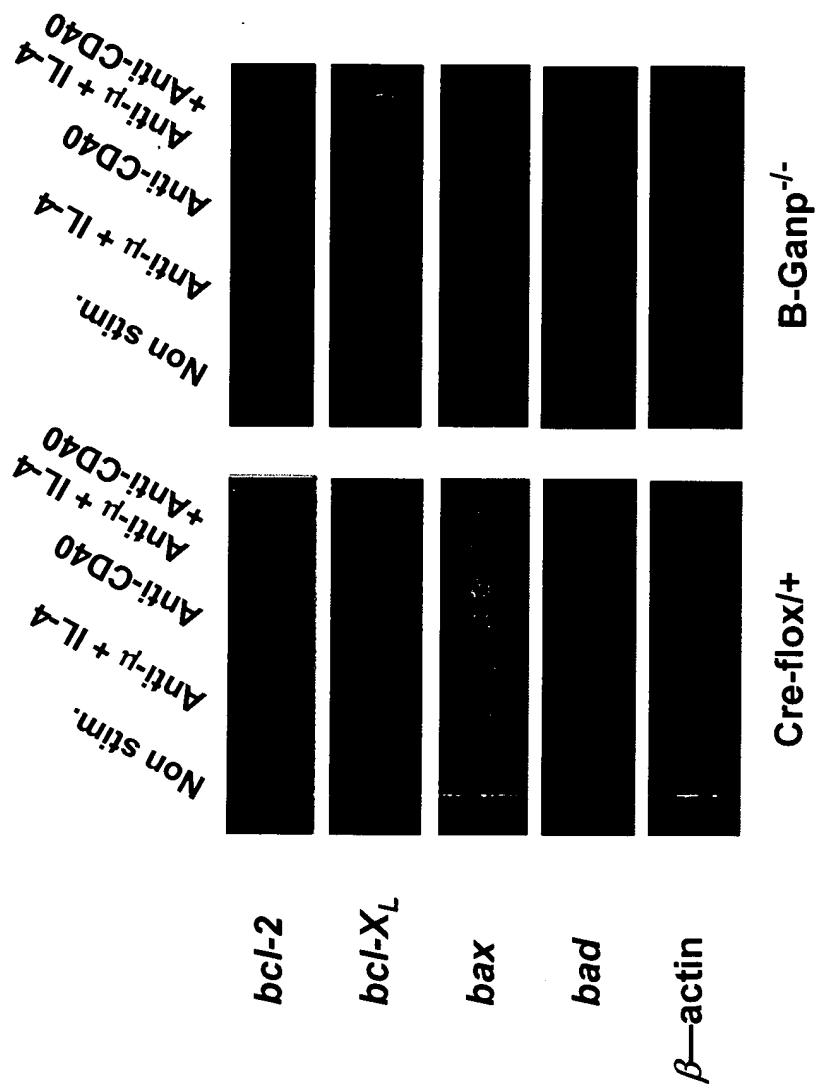


Fig. 28

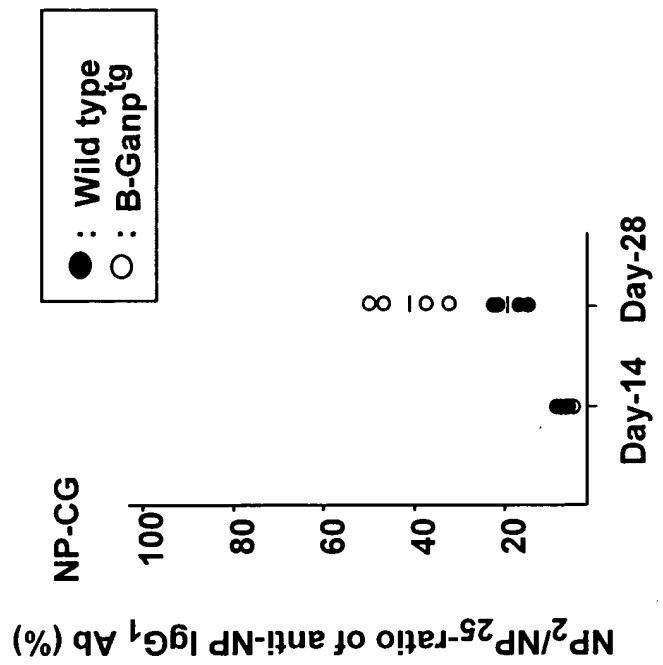


Fig. 29

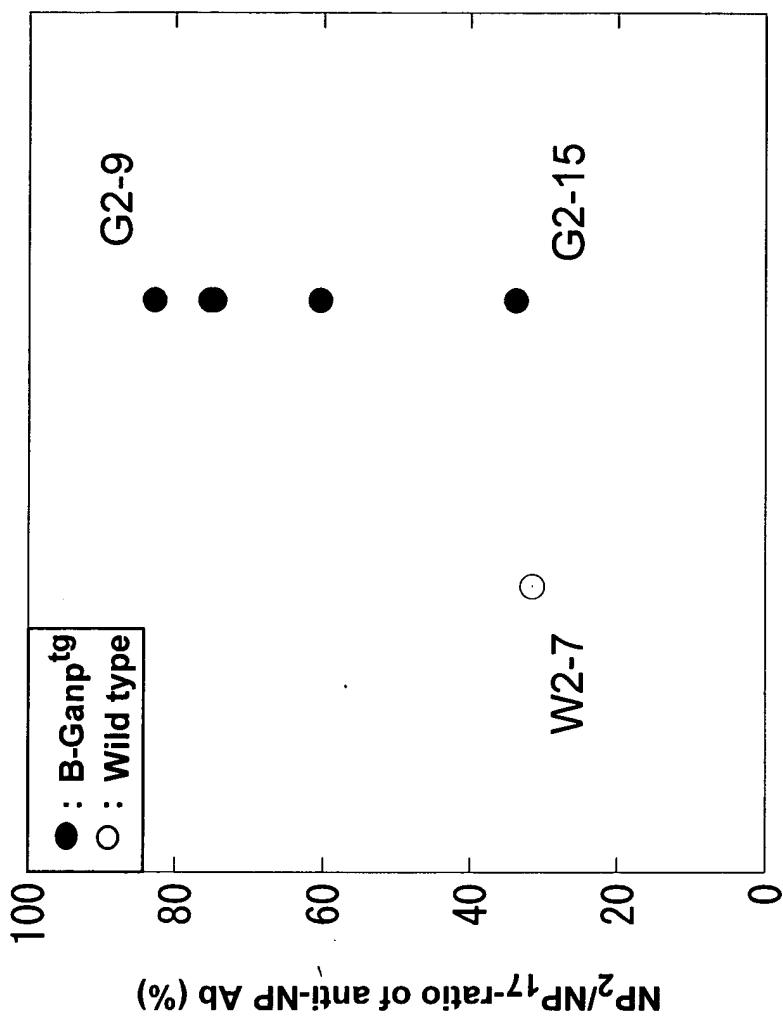
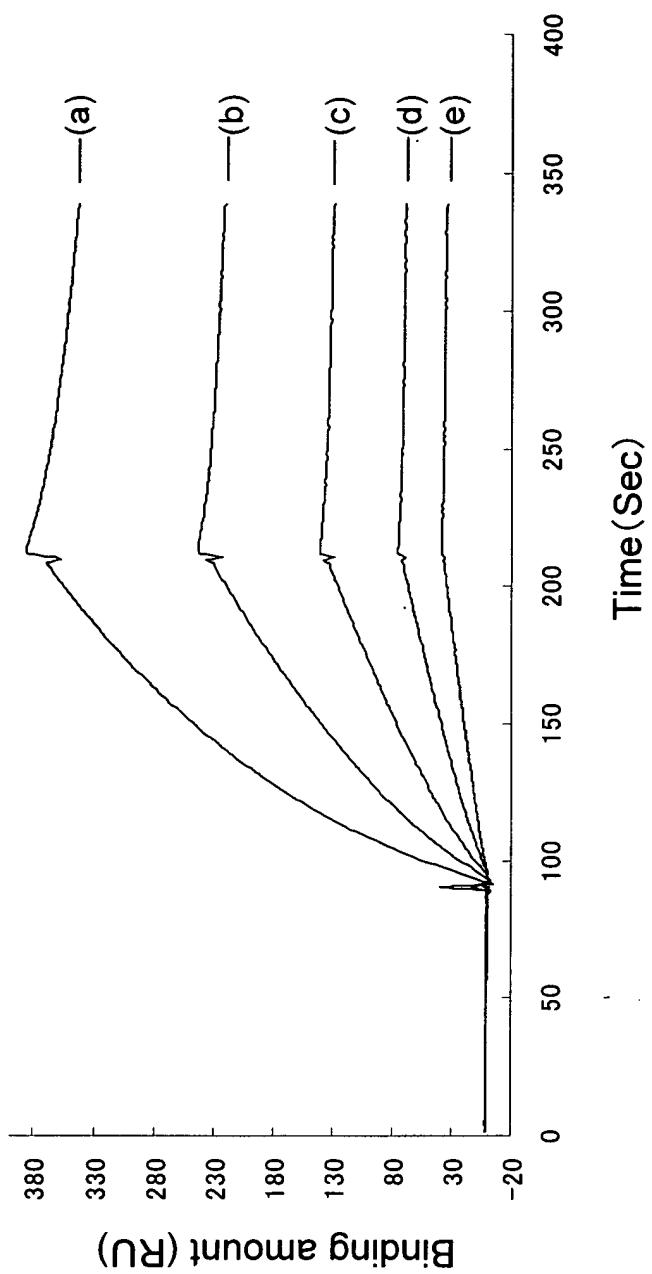


Fig. 30

BIACORE (G2-9, IgG1, κ)



BIACORE (G2-15, IgG1, λ)

Fig. 31

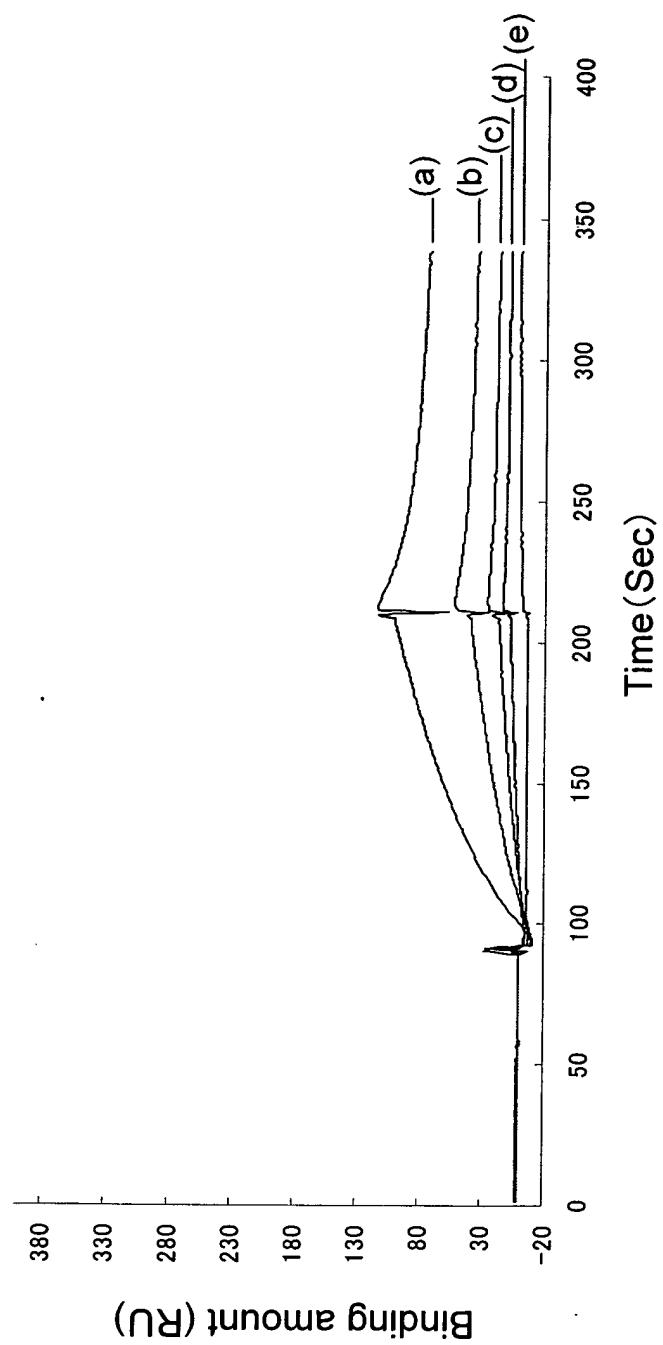


Fig. 32

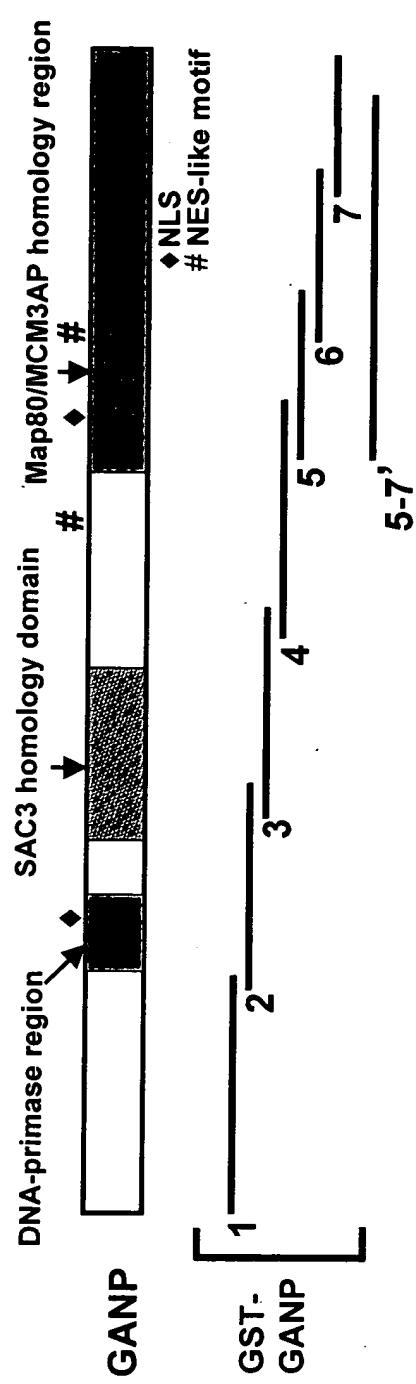


Fig. 33

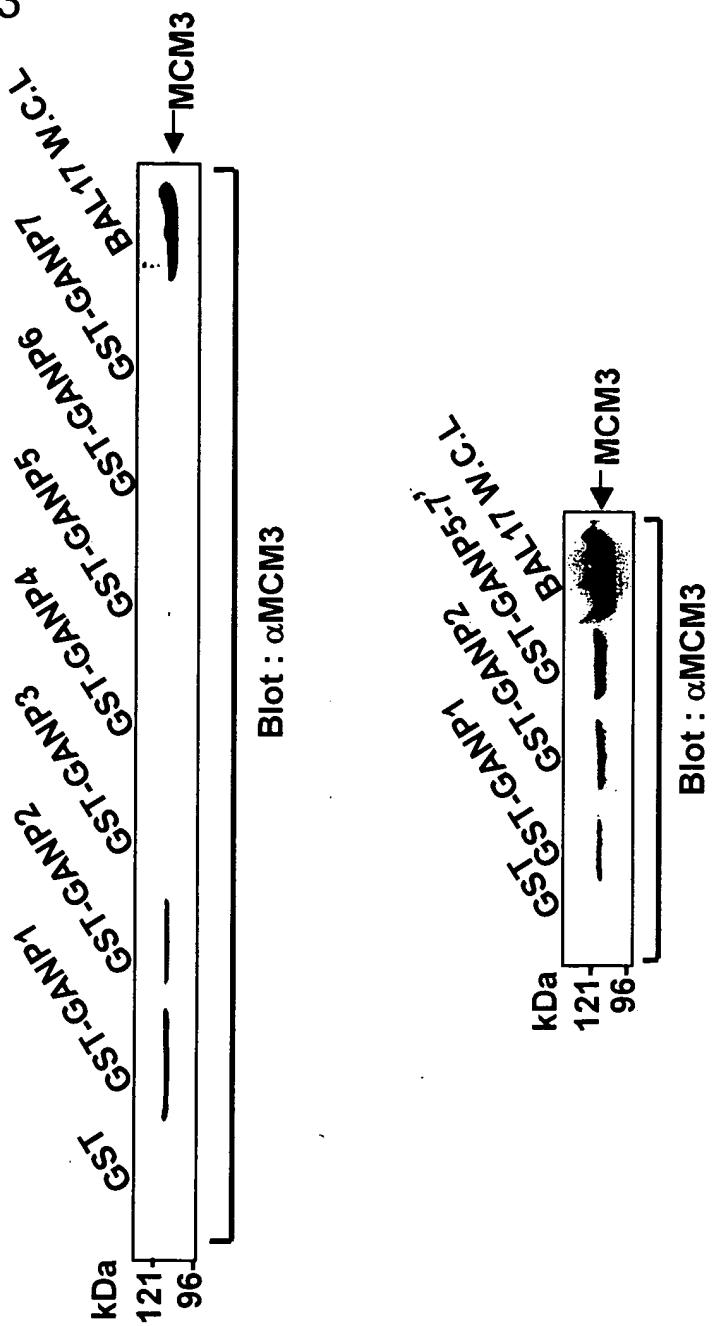


Fig. 34

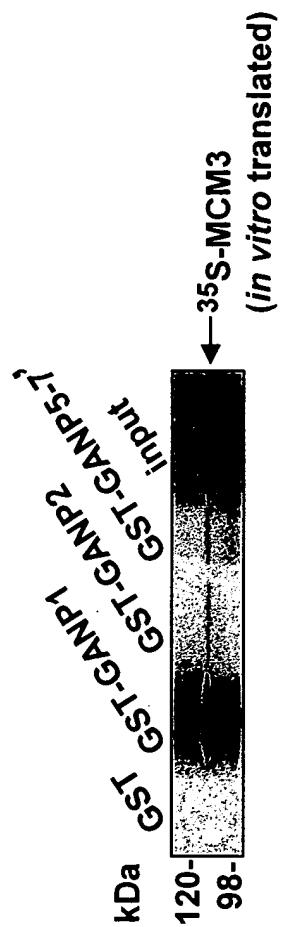


Fig. 35

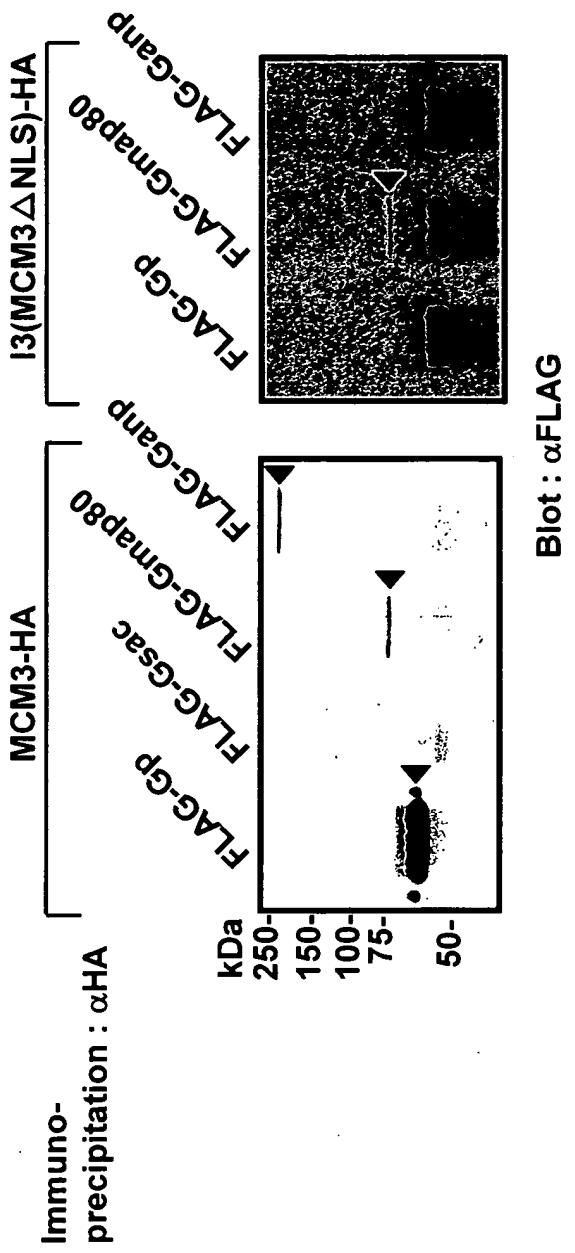


Fig. 36A

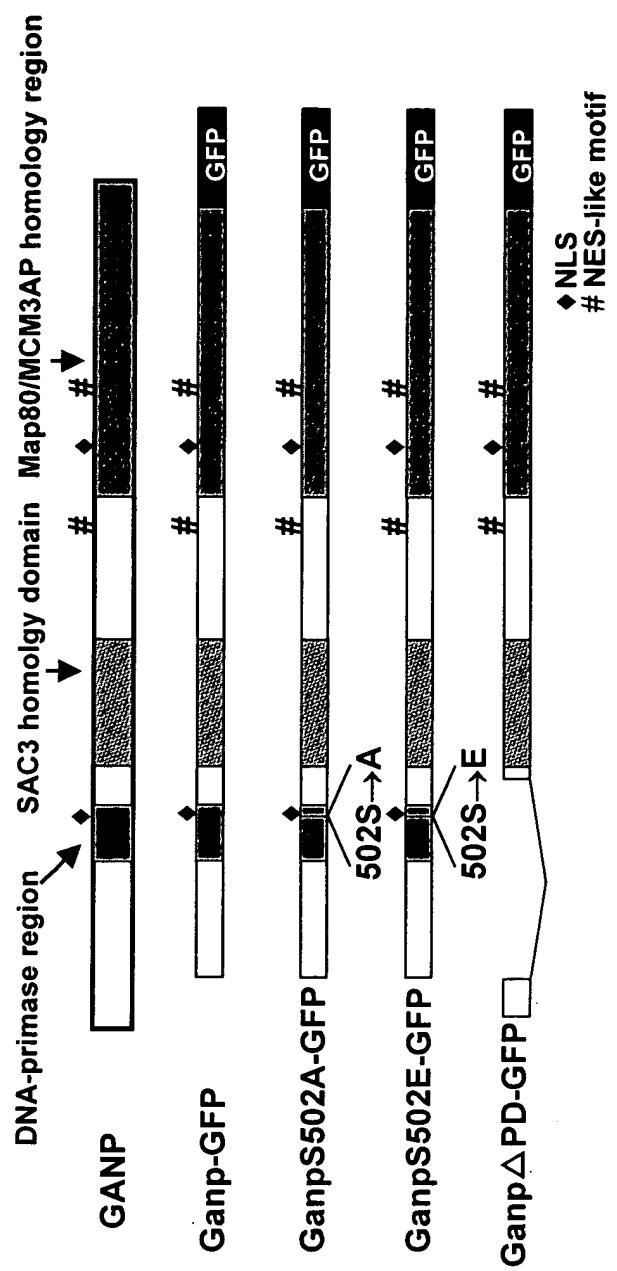


Fig. 36B

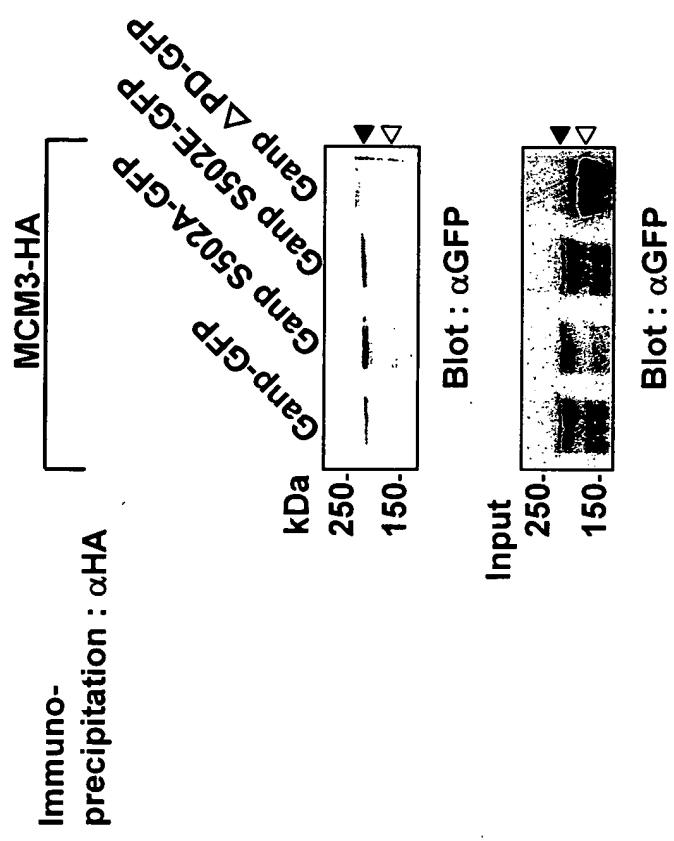


Fig. 37

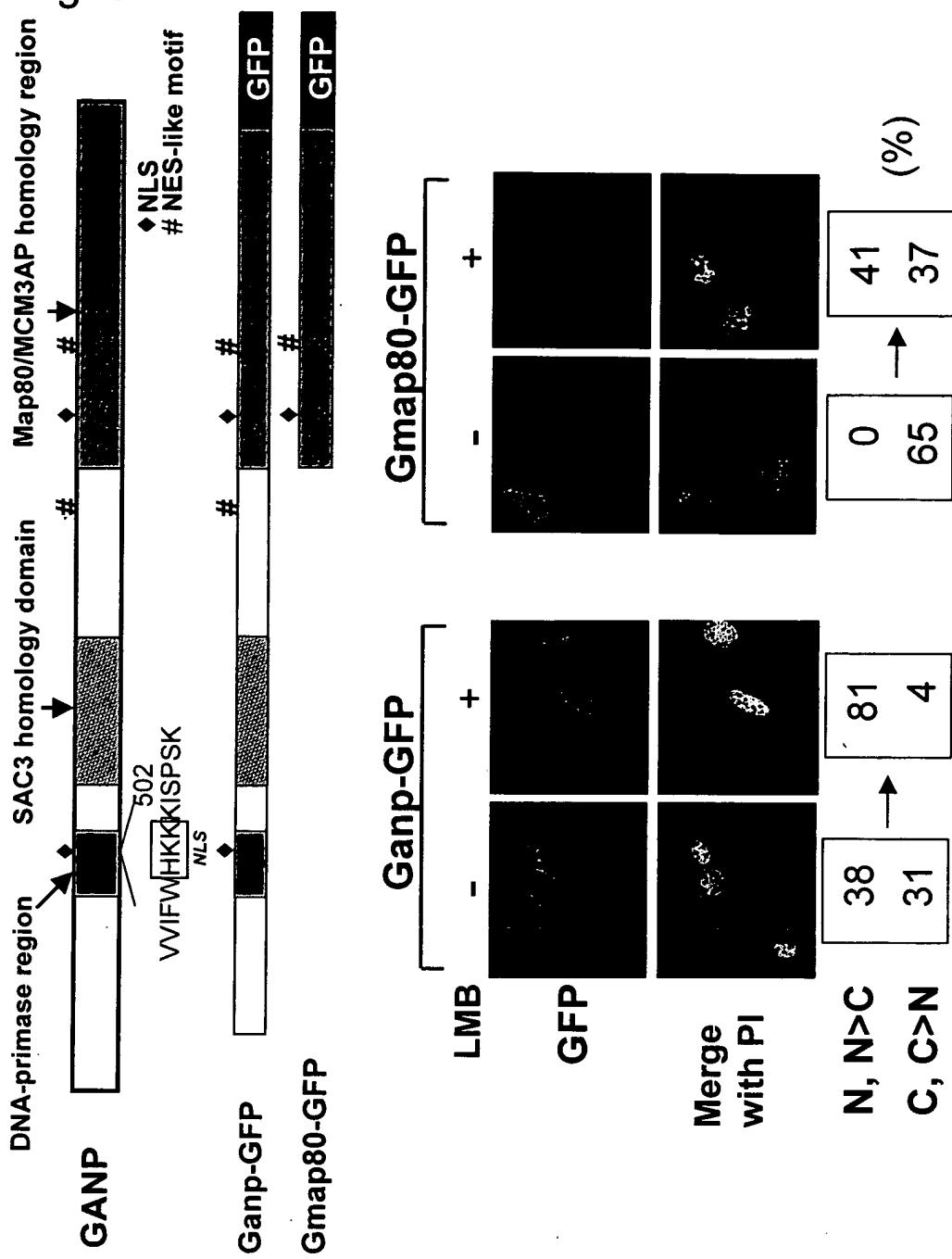


Fig. 38

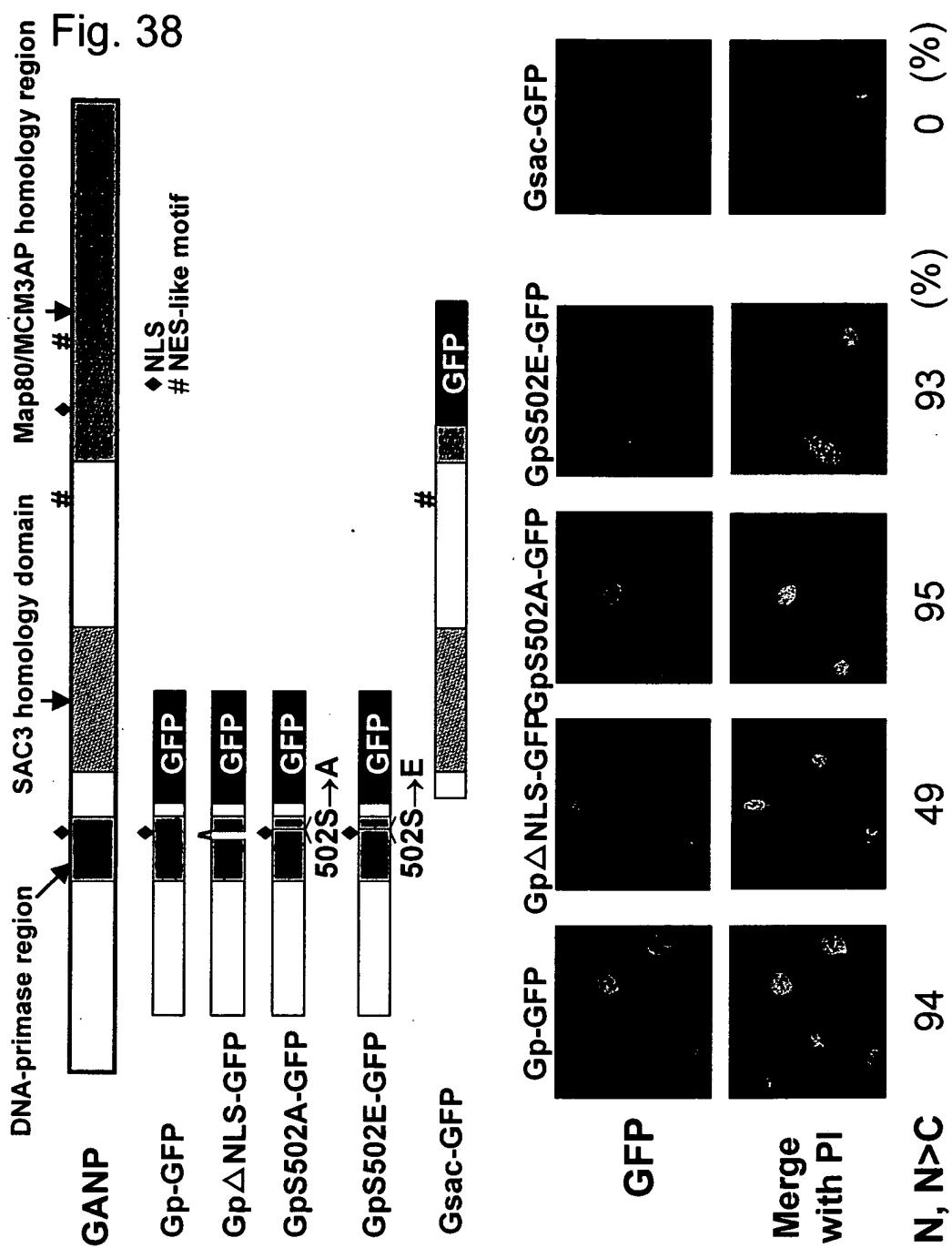
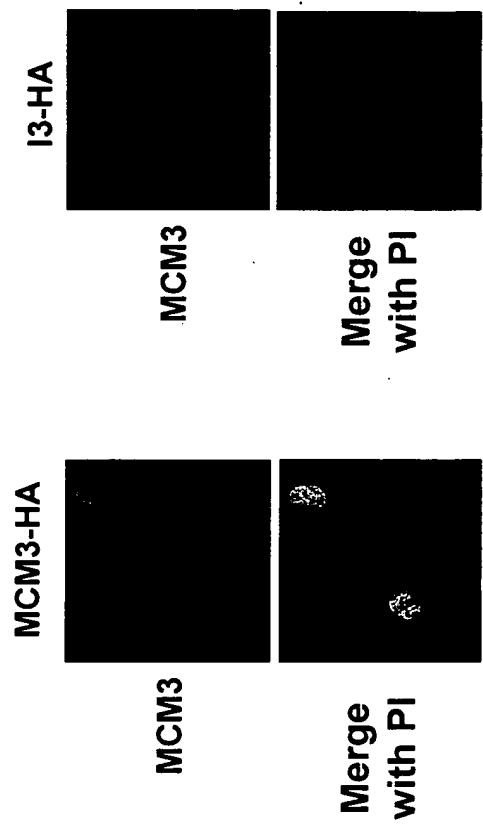
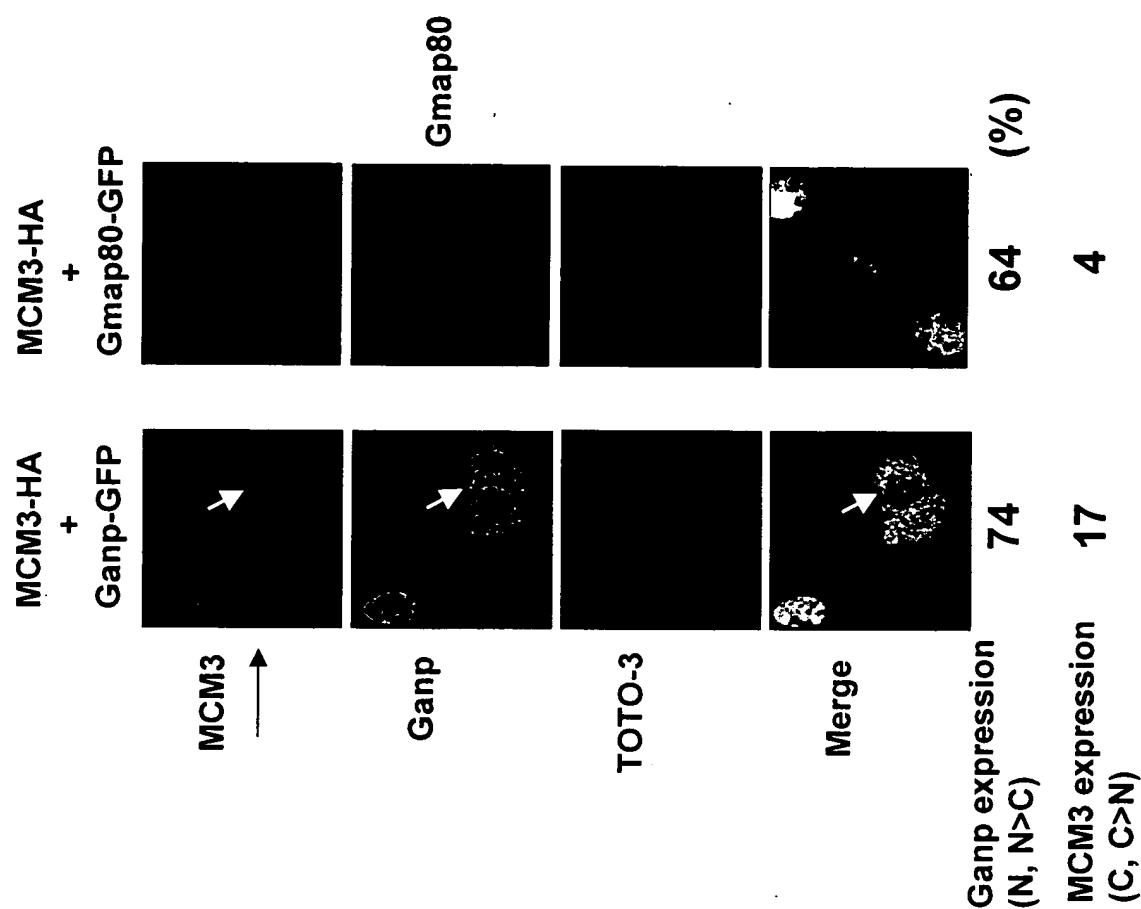


Fig. 39



10/53404

Fig. 40



10/534043

Fig. 41

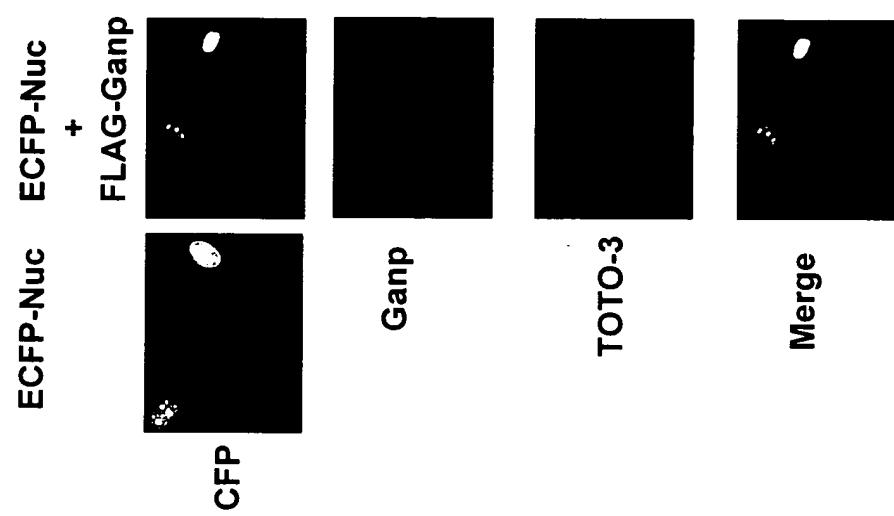


Fig. 42

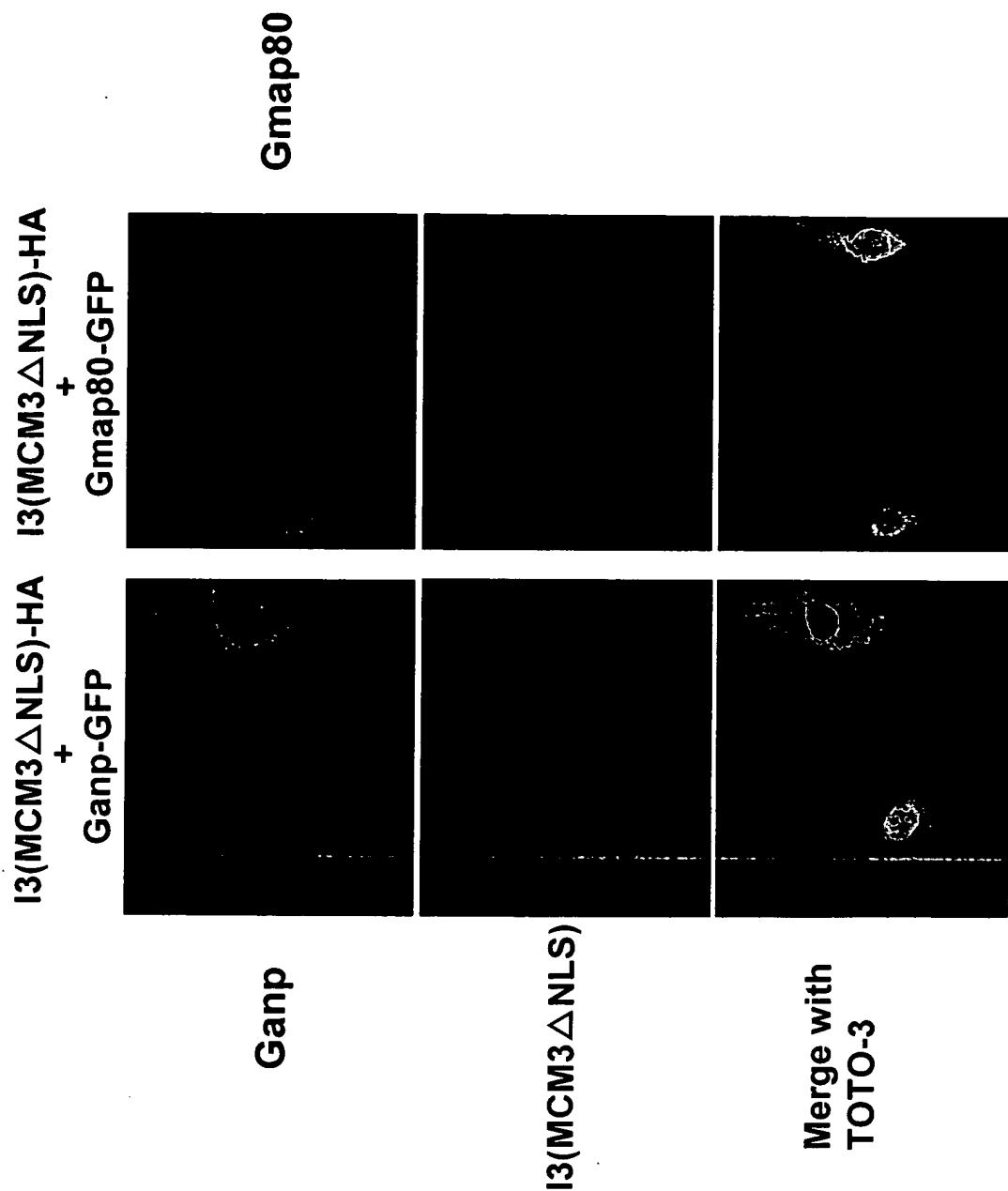
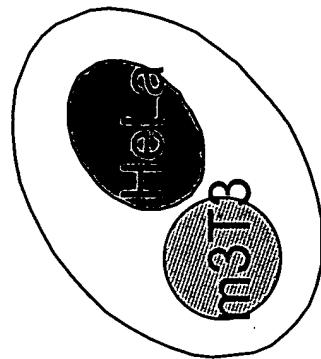
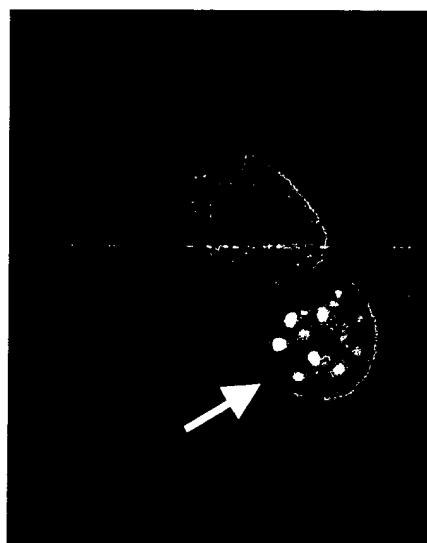


Fig. 43

MCM3-HA



Hoechst



Phase contrast

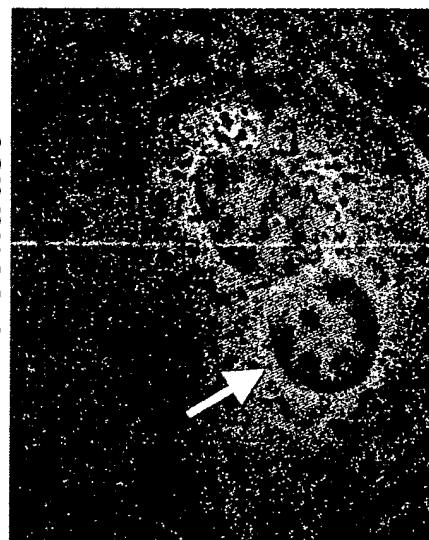
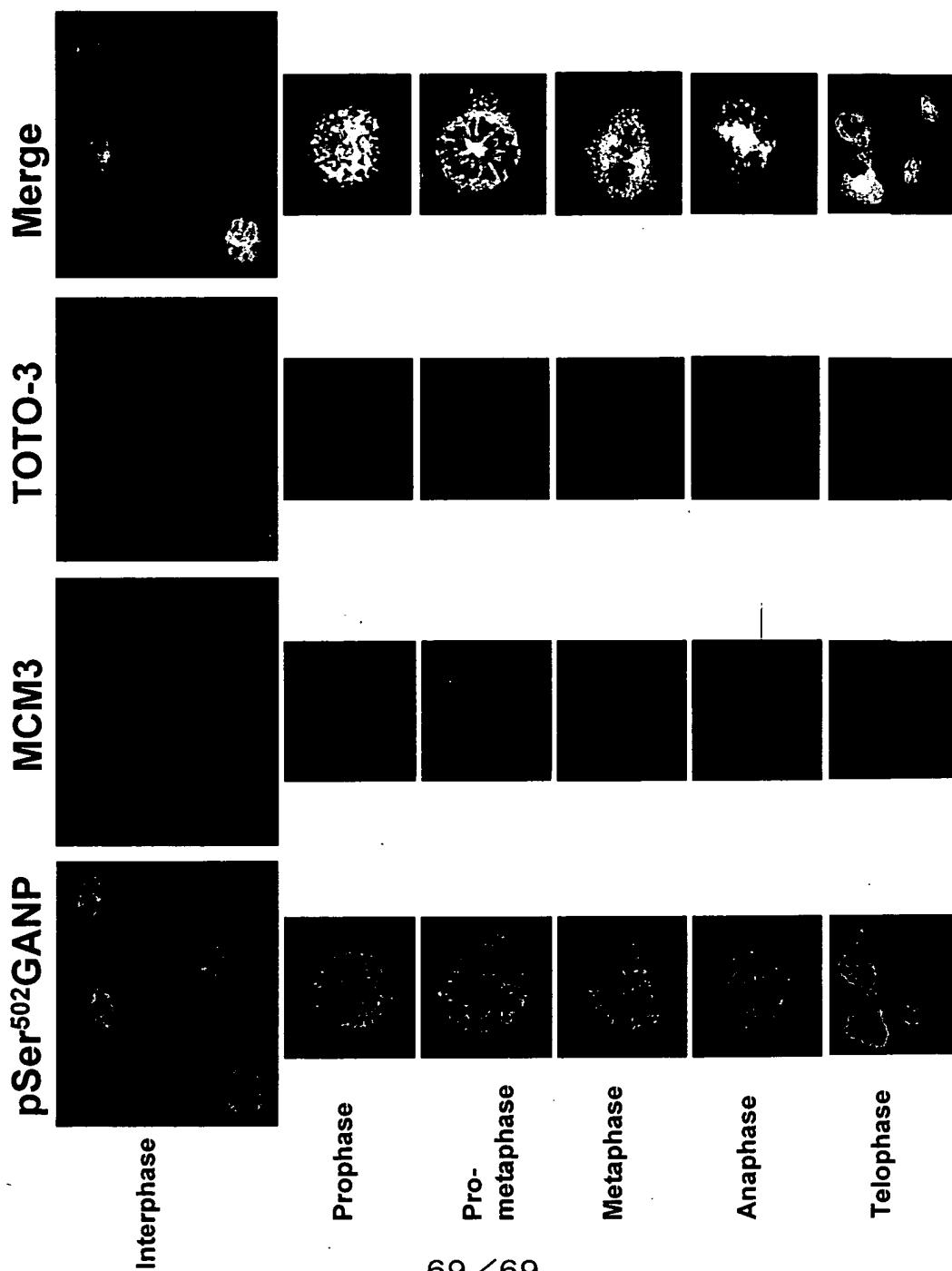


Fig. 44



69 / 69